

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann

Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**Untersuchung zur Expression von VEGF und HIF-1 α im Zusammenhang mit der
Einheilung unterschiedlicher nanofaserbasierter Knochenersatzstoffe**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
im Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Theresa Magdalena Hauser, geborene Gärtner

aus Bruchsal

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
04.04.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. M. Schofer

1. Korreferent: Prof. Dr. T. Plant

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1. Aufbau und Funktion des Knochens	7
1.2. Knochendefektheilung.....	8
1.2.1. Primäre Knochendefektheilung.....	9
1.2.2. Sekundäre Knochendefektheilung	10
1.2.3. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).....	12
1.3. Angiogenese.....	13
1.3.1. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α).....	14
1.3.2. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - A	15
1.4. Knochenersatzmaterialien	16
1.4.1. Anorganische Knochenersatzmaterialien.....	17
1.4.2. Organische Knochenersatzmaterialien	18
1.5. Nanofasern.....	22
1.5.1. Elektrospinning.....	26
1.6. Fragestellung.....	27
2. Material und Methoden.....	27
2.1. Herstellung der Nanofasern.....	27
2.2. Probenmaterial	27
2.3. Immunhistochemie	28
2.3.1. Anfertigung der Schnittpräparate	28
2.3.2. Rehydrierung der Präparate.....	29
2.3.3. VEGF.....	30
Tag 1	30
Tag 2	31

2.3.4.	HIF-1 α	33
Tag 1		33
Tag 2		34
2.3.5.	Dehydrierung der Präparate.....	35
2.3.6.	Histologische Auswertung	36
2.3.7.	Statistische Analysen	36
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Deskriptive Betrachtung der Immunhistochemie	39
3.1.1.	Nachweis VEGF positiver Zellen im Defektareal	39
3.1.2.	Nachweis VEGF positiver Zellen in neugebildetem Knochen.....	42
3.1.3.	Nachweis von HIF-1 α positiven Zellen im Defektareal.....	46
3.1.4.	Nachweis von HIF-1 α positiven Zellen in neugebildetem Knochen.....	51
3.2.	Tabellarische Deskriptive Statistik	55
4.	Diskussion.....	58
	Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Nanofaseraffolds.....	61
	Untersuchungszeitpunkte	62
	Zusätzliches Einbringen von VEGF in die Nanofaseraffolds.....	63
	Positiver Nutzen durch einen VEGF-Zusatz.....	66
	Limitation der Studie	67
5.	Zusammenfassung.....	68
5.1.	Summary	69
6.	Abbildungsverzeichnis.....	70
7.	Tabellenverzeichnis	73
9.	Abkürzungsverzeichnis	74
10.	Literaturverzeichnis	76
11.	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	86

12.	Danksagung	87
-----	------------------	----

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Funktion des Knochens

Die Aufgabe des Knochens im menschlichen Körper ist einerseits zusammen mit Knorpel die Stützfunktion mit Formgebung und Stabilität, andererseits dient er als Calcium und Phosphatspeicher (Schiebler und Korf 2007). Im Allgemeinen baut sich Knochen aus einem inneren, spongiösen Teil, der das Knochenmark enthält, und einer harten, äußeren Knochenschicht, der sogenannten Kompakta auf (Downey und Siegel 2006). Diese beiden Knochenarten unterscheiden sich vor allem in ihrer Dichte, ihrer dreidimensionalen Anordnung und metabolischen Aktivität (Buck und Dumanian 2012). Die äußere und innere Schicht des Knochens wird von Bindegewebe überzogen, dem Periost und innen dem Endost, worin sich Gefäße, Nerven und Stammzellen befinden (Schiebler und Korf 2007). In der inneren Organisation des Knochens unterscheidet man durch die Anordnung der Kollagenfibrillen zwischen dem beim Erwachsenen am häufigsten vorkommenden Lamellen- und dem Geflechtknochen, der eine irreguläre Anordnung der Kollagenfasern und eine höhere Zahl an Osteozyten, aber geringere Mineraliendichte aufweist (Schiebler und Korf 2007). Der Knochen selbst setzt sich aus der Interzellulärsubstanz und Osteozyten zusammen. Die Interzellulärsubstanz besteht sowohl aus organischen Bestandteilen, wie Typ-1-Kollagen, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Sialoproteinen, als auch dem anorganischen Mineral Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (Boos et al. 2010). In diese Matrix sind neben vielen anderen Zellen die funktionelle Einheit aus Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten gebettet. Osteoblasten bilden die organische und anorganische Interzellulärsubstanz, worin sich einige von ihnen einschließen und zu Osteozyten werden (Aubin 1998). Gleichzeitig stehen sie in engem Zusammenspiel mit den Osteoklasten, deren Entstehung sie induzieren können. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die im Gegensatz zu Osteoblasten aus hämatopoetischen Stammzellen und nicht aus Osteoprogenitorzellen hervorgehen und durch Ansäuerung die anorganischen, sowie durch Lyse die organischen Knochenbestandteile abbauen (Schiebler und Korf 2007). Die Osteozyten liegen im reifen Knochen in Knochenhöhlen

und stehen über ihre Zellfortsätze miteinander und zu feinen Kapillaren in Verbindung (Schiebler und Korf 2007, Downey und Siegel 2006).

1.2. Knochendefektheilung

Knochendefekte können durch Tumorexzisionen, Osteomyelitiden, Knochennekrosen oder Frakturen entstehen. Ihre Therapie wird vor allem bei größeren Defekten durch die nicht immer einfache und oft mit Nebenwirkungen verbundene Gewinnung autologer Beckenkammspongiosa oder gestielter, vaskularisierter autologer Knochentransplantate stark limitiert (Boos et al. 2010, Schieker, Heiss und Mutschler 2008). Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl an Knochenersatzmaterialien entwickelt, die versuchen, der Biologie des Knochens so nahe wie möglich zu kommen und dennoch leicht herzustellen sind, um die Heilung von Knochendefekten zu erleichtern.

Der Prozess der Knochendefektheilung stellt einen komplexen Vorgang dar, der nicht zur Entstehung von Narbengeweben, sondern zur Entwicklung von biomechanisch stabilem Knochenregenerat führt. Diese Besonderheit basiert auf dem Zusammenspiel von Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsprozessen von Zellen, welche an die Wirkung von Wachstumsfaktoren, der Sauerstoffversorgung des Defektareals und dessen mechanische Stabilität, sowie an den Gesundheitszustand des Patienten gekoppelt sind (Axelrad et al. 2007). Des Weiteren werden während des Reparaturvorganges Schritte aus der embryonalen Knochenentwicklung wiederholt, die in der Embryogenese besonders die zelluläre Differenzierung und das Wachstum steuern (Gerstenfeld et al. 2003). Zusammengefasst sind vier Elemente für die Knochendefektheilung notwendig: Osteogene Zellen wie Osteoblasten oder Osteoprogenitorzellen, osteoinduktive Signale, die durch Wachstumsfaktoren gegeben werden, eine osteokonduktive Matrix und eine gute Blut- sowie Nährstoffversorgung (Hing 2004).

Auf molekularer Ebene spielen bei der Knochendefektheilung vor allem drei Gruppen von körpereigenen Signalmolekülen eine Rolle: (1) **proinflammatorische Cytokine**, die

vor allem in der ersten (Entzündungsreaktion) und der vierten (Remodeling) Phase der Knochendefektheilung auftreten, wie die Interleukine IL-1, IL-6 oder der TNF- α (*tumour necrosis factor-alpha*) (Einhorn et al. 1995), (2) die **TGF- β** (*transforming growth factor- β*) Superfamilie zu denen BMP-2 (*bone morphogenic protein-2*, vgl. 1.2.3) gezählt wird, sowie andere Wachstumsfaktoren und (3) **Angiogenese fördernde Faktoren** wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder Angiopoietin (Dimitriou, Tsiridis und Giannoudis 2005, Gerstenfeld et al. 2006).

Abhängig von der Entfernung der Defektränder oder bei einer Fraktur der Frakturrenden unterscheidet man die primäre (direkte) von der sekundären (indirekten) Knochendefektheilung (Bohndorf, Imhof und Fischer 2006, Dimitriou et al. 2005).

1.2.1. Primäre Knochendefektheilung

Die primäre Knochendefektheilung, auch als direkte bezeichnet, geht von den Osteonen (Haverssches System) aus, ohne ein radiologisch sichtbares Kallusgewebe zu bilden (lat. *Callus*, dicke Haut, Schwielen, hier: neugebildetes Knochengewebe). Hierfür ist die Voraussetzung eine maximale Spaltbreite von 0,5 mm (Bohndorf et al. 2006) und mechanisch stabiles aneinander Liegen von ausreichend vaskularisierten Knochenrändern (Dimitriou et al. 2005). Ist dies gegeben, kommt es durch Osteoklasten zu einer direkten Überbrückung des Spaltes zwischen den Knochenfragmenten und einer Eröffnung des gegenüberliegenden Fragmentes. Hierdurch können sowohl kapillare Gefäßschlingen, als auch mesenchymale Stammzellen (MSC) folgen, die sich zu Osteoblasten entwickeln und den längs zum Bruchspalt verlaufenden Kanal durch die Bildung von Kollagen und Glykoproteinen, dem sogenannten Osteoid auffüllen. Insgesamt ist die primäre Kontaktheilung selten (Einhorn 1998) und dauert ca. 1,5 - 2 Jahre (Henne-Bruns et al. 2007).

1.2.2. Sekundäre Knochendefektheilung

Die sekundäre oder indirekte Knochendefektheilung kann in vier Phasen eingeteilt werden (Abbildung 1): die Entzündungsphase, die Granulationsphase, die Bildung des harten Kallus und die Umgestaltung des Knochens (*remodeling*).

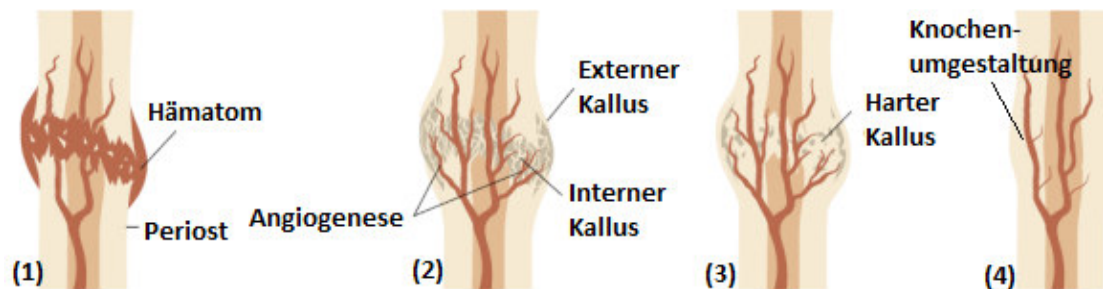


Abbildung 1: Stadien der sekundären Knochendefektheilung: (1) *Entzündungsphase* mit Hämatombildung, (2) *Granulationsphase* mit der Bildung des weichen Kallus über desmale Ossifikation der externe Kallus und über chondrale Ossifikation der interne Kallus, (3) *Bildung des harten Kallus* durch Mineralisation und Bildung von Geflechtknochen, (4) *Knochenumgestaltung (Remodeling)* mit funktioneller Adaptation zu lamellärem Knochen unter Abbau von überschüssigem Kallus. Modifiziert nach Carano und Filvaroff (Carano and Filvaroff 2003).

Zu Beginn der ersten Phase steht das Hämatom, welches als Folge einer Schädigung von Gefäßen, die im Knochen, Knochenmark, Periost und im umliegenden Weichteilgewebe lokalisiert sind, entsteht (Ai-Aql et al. 2008). Hierdurch wird die Koagulation aktiviert und die Entzündungsphase eingeleitet (Carano und Filvaroff 2003). Diese dauert zwischen 0 – 5 Tagen (Simmons 1985). Mit dem Hämatom folgen die Aktivierung und der Einstrom multipler Zellarten aus dem Blut. Die Hauptrolle kommt in dieser Phase Thrombozyten, Cytokinen und BMPs, sowohl aus der Knochenmatrix, als auch aus den MSC zu (Dimitriou et al. 2005), aber auch Entzündungszellen, die durch die zerfallenden Gewebefragmente angelockt werden, wie Lymphozyten, polymorphkernige Leukozyten, Histiozyten, Monozyten und Makrophagen spielen durch ihre Interleukinausschüttung eine Rolle (Carano und Filvaroff 2003, Gerstenfeld et al. 2003). Durch die Expression verschiedener Signalmoleküle, wie TGF- β , PDGF und BMP-2 wird die Kallusbildung initiiert (Ai-Aql et al. 2008). Der von den Makrophagen produzierte MDGF (*macrophage-derived growth factor*) führt zur Proliferation von Osteoblasten und Chondrozyten (Simmons 1985). Als

Zweites folgt nach dem Abklingen von Schmerzen und Schwellung, die Granulationsphase mit der Bildung des weichen Kallus über ca. 3 - 4 Wochen (s. Abbildung 1, (2)) (Bohndorf et al. 2006). Dieser Zeitraum beinhaltet einerseits den Beginn der Neo-Angiogenese und Einwachsen von Gefäßen aus dem Periost (Ai-Aql et al. 2008), andererseits die Formierung des Kallus, der die Defektenden überbrückt, jedoch noch nicht die ursprüngliche Festigkeit des Knochens aufweist. Der Kallus entsteht auf zwei Wegen (Carano und Filvaroff 2003), die durch verschiedene Signalmoleküle und den Ursprung der jeweiligen MSC beeinflusst werden (Gerstenfeld et al. 2003). Während die im Granulationsgewebe befindlichen MSC innerhalb von 24 Stunden direkt zu Osteoblasten differenzieren und so im Verlauf Osteoid bilden können, entsteht der interne Kallus über den Vorgang der desmalen Ossifikation (Santos und Reis 2010). Gleichzeitig läuft in mechanisch weniger stabilen Regionen (Le et al. 2001), die direkt an die Defektränder grenzen, die chondrale oder indirekte Ossifikation ab, infolge derer der externe weiche Kallus gebildet wird (Carano und Filvaroff 2003). Hierbei entwickeln und proliferieren ab dem dritten Tag MSC zu Chondroblasten, die über die Differenzierung zu Chondrozyten avaskuläres Knorpelgewebe mit den Bestandteilen Kollagen-Typ-II und Proteoglykanen synthetisieren, wobei die höchste Differenzierungs- und Proliferationsrate zwischen dem 7. und 21. Tag stattfindet (Dimitriou et al. 2005). Nun schließt sich in der dritten Phase die Knorpelresorption und primäre Knochenbildung an (s. Abbildung 1, (3)) (Gerstenfeld et al. 2003). Der interne Kallus wird mit Calciumhydroxyapatit $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$ mineralisiert und wandelt sich zu hartem Kallus bestehend aus Faserknochen (Syn. Geflechtknochen), was den ersten Schritt zur Stabilisierung und Wiedererlangung der biomechanischen Funktion des Knochens darstellt (Ai-Aql et al. 2008, Gerstenfeld et al. 2006). Aus diesem Netzwerk von Faserknochenbälkchen entsteht in der vierten Phase schließlich sekundärer lamellärer Knochen (s. Abbildung 1, (4)) (Carano and Filvaroff 2003). Im Knorpelbereich kommt es zu einer Hypertrophie, Kalzifizierung und Apoptose mancher Chondrozyten, gleichzeitig zu einer vermehrten Vaskularisation des Gewebes und Differenzierung anderer Chondrozyten zu Osteoblasten (Kanczler und Oreffo 2008). Über die Rekrutierung von Osteoklasten wird Knorpelgewebe resorbiert und durch mit Knochenmark gefüllten Geflechtknochen

ersetzt (Dimitriou et al. 2005). Am Ende des Heilungsprozesses steht als vierte Phase die sekundäre Knochenbildung und -resorption mit der Knochenumgestaltung, dem sogenannten *Remodeling*. Es wird der hypertrophe Kallus in den Ausgangszustand des Knochens überführt: seine anatomische Form, seine biomechanische Funktion und die Vaskularisation gehen auf ihr Ursprüngliches zurück (Gerstenfeld et al. 2003).

1.2.3. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) gehören zur Transforming Growth Factor- β (TGF- β) – Superfamilie (Wozney et al. 1988), die eine große Anzahl an Wachstums- und Differenzierungsfaktoren einschließt. Hierzu zählen die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) außer BMP-1 (Solheim 1998, Kessler et al. 1996), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Growth Differentiation Factor (GDFs), Aktivin, Inhibin und das Anti-Müller-Hormon (Dimitriou et al. 2005). Bereits von 34 verschiedenen Mitgliedern dieser Superfamilie wurde der genetische Code entschlüsselt (ten Dijke et al. 2003). BMPs sind pleiotrope Strukturgene (Dimitriou et al. 2005) mit der größten osteoinduktiven Potenz bekannter Proteine (Bostrom et al. 1995), die durch MSC, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, extrazellulärer Knochenmatrix und Chondrozyten produziert werden (Ai-Aql et al. 2008). Je nach Konzentration können sie Prozesse inhibieren, aber auch aktivieren (Sakou 1998), so beeinflussen sie unter anderem Wachstum, Differenzierung und Apoptose verschiedener Zelltypen (Dimitriou et al. 2005) wie Osteoblasten, Chondroblasten, neuronalen und epithelialen Zellen (Sakou 1998). Während der Knochendefektheilung bewirken vor allem BMP-2, BMP-6 und BMP-9 die Differenzierung pluripotenter MSC über Osteoprogenitorzellen in Osteoblasten und schließlich in Osteozyten (Cheng et al. 2003), aber auch die Entwicklung zu Chondrozyten wird eingeleitet (Dimitriou et al. 2005).

BMP-2 spielt eine führende Rolle in der Knochenheilung, da es als erstes Gen bei der Osteogenese aktiviert wird und während allen vier Phasen der sekundären Knochenheilung exprimiert wird (Ai-Aql et al. 2008). Während dieser Zeit rekrutiert es MSC, aktiviert die Knorpelbildung, initiiert die Knochenheilungskaskade und reguliert die mRNA Expression von BMP-3 und BMP-4, was zu einer gesteigerten Sekretion des

Knochendifferenzierungsmarkers Osteopontin führt (Bostrom et al. 1995). Darüber hinaus besitzt BMP-2 über die Stimulierung der VEGF-Expression angiogenes Potential, aber auch Synthese und Sekretion anderer Knochen- und Gefäßwachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF werden durch BMPs beeinflusst (Deckers et al. 2002, Schofer et al. 2009c).

1.3. Angiogenese

Es gibt zwei verschiedene Wege, die zu einer optimalen Blutversorgung führen - der Voraussetzung für eine gute Knochenheilung (Gerstenfeld et al. 2003): die Vaskulogenese, unter welcher man die *de novo* Gefäßbildung von Angioblasten ausgehend versteht, und die Angiogenese oder Neovaskularisation, bei der neue Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen heraus sprossen (Carmeliet 2000). Beide Prozesse bedürfen einer Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Molekülen (Gupta und Zhang 2005). Die Angiogenese beginnt mit einer Vasodilatation bereits bestehender Blutgefäße, die durch Stickstoffmonoxid (NO) getriggert wird (Carmeliet 2000). Die zunehmende Aktivierung der NO-Synthase in Endothelzellen wird ihrerseits über VEGF induziert (Distler et al. 2003). Durch das freigesetzte NO wird die Guanylcyclase stimuliert und cGMP (cyclic *guanosine monophosphate*) produziert, was durch die Relaxation der glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*) zur Vasodilatation führt (Carmeliet 2000). Neben dieser Hochregulation von NO bewirkt VEGF mit einer 50.000-fach höheren Potenz als Histamin eine erhöhte Durchlässigkeit der Endothelzellen ohne diese zu schädigen, wodurch Plasmaproteine wie Fibrinogen und Plasminogen austreten können und so eine Matrix für die folgende Anlagerung der Endothelzellen bilden (Distler et al. 2003, Nagy et al. 2006, Senger et al. 1993). Diese Hyperpermeabilität wird durch die Bildung von vesikulo-vakuolären Organellen (VVO) in den Endothelzellen erreicht, welche untereinander durch *fenestrae* kommunizieren (Kohn et al. 1992). Durch Angiopoietin 2 und andere Proteasen wie Plasminogen-aktivator, Chymase und Matrix-Metalloproteasen (MMPs), abhängig von der jeweils umgebenden Extrazellulärmatrix, folgt eine Lockerung der Gefäßzellwand, der Basalmembran und ein Abbau der perivaskulären Matrix als Vorbereitung für die

anschließende Auswanderung und Proliferation von Endothelzellen (Distler et al. 2003). Gleichzeitig bewirken sie die Aktivierung und Freisetzung der angiogenen Moleküle einschließlich VEGF, FGF (*fibroblast growth factor*) und IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) (Carmeliet 2000). Die nun anstehende Migration der Endothelzellen vollzieht sich anhand eines Gradienten chemotaktischer Signale, der die Endothelzellen in einen Bereich der gelockerten perivaskulären Matrix mit reduzierter Gefäßdichte leitet, wo sie sich zunächst einschichtig zusammenlagern und bereits röhrenähnliche Strukturen bilden (Distler et al. 2003). Der Durchmesser des neu entstehenden Gefäßes wird wiederum durch VEGF-Isoformen beeinflusst, aber auch durch Angiopoietin 1 in Verbindung mit VEGF, durch die Integrine $\alpha_v\beta_3$ oder α_5 und durch den Transkriptionsfaktor MEF2C (*myocyte enhancer binding factor 2C*) (Carmeliet 2000). Abschließend wird das junge Gefäß durch sich von außen anlagernde mesenchymale Zellen aus der umgebenden Matrix stabilisiert (Distler et al. 2003). Befinden sich diese mit den Endothelzellen innerhalb der Basalmembran, differenzieren sie zu Pericyten oder, wenn sie der Basalmembran anliegen, in mit spezifischen kontraktilen Filamenten ausgestattete sogenannte *smooth muscle cells* (Kurz 2000).

1.3.1. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)

HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor der basic Helix-Loop-Helix Familie (Distler 2003). Es werden bei den Transkriptionsfaktoren insgesamt fünf verschiedene Proteinfamilien unterschieden: die Leucin-Zipper-, die Zink-Finger-, die Helix-Loop-Helix-, die Homöodomänen- und die Helix-Turn-Helix-Proteine (Graw 2010). Diese Proteine binden sequenzspezifisch an regulatorische DNA-Abschnitte und beeinflussen so die Gentranskription. Hieraus resultieren eine erhöhte Proteinsynthese und eine veränderte Zellfunktion. Auf lange Sicht sind sie somit wichtig für die Zellfunktion, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (Barnes 2006).

HIF-1 α besitzt ein Gewicht von 120 kDa und besteht aus 826 Aminosäuren (Wang et al. 1995). Sinkt der extrazelluläre pO_2 unterhalb von 20 mmHg und es besteht folglich eine Hypoxie, steigt die Synthese je nach Zellart von HIF-1 α steil an (Jiang et al. 1996b). Das Protein wird vom Cytoplasma in den Zellkern transloziert und dimerisiert dort mit HIF-

1 β (ARNT; *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) zum $\alpha\beta$ -Heterodimer, dem HIF-1-Komplex, um anschließend an das *hypoxia-responsive-element* (HRE) auf regulatorischen DNA-Abschnitten von hypoxieinduzierten Genen zu binden (Distler 2003, Jiang et al. 1996a). Dies führt im Folgenden über die Expression von mehr als 60 verschiedenen Zielgenen zu einer Wirkungskaskade, die das O₂-Angebot erhöht und den O₂-Bedarf senkt (Gaber et al. 2005, Weiss 2004). Hierzu zählt die Expression von VEGF und dem VEGF-Rezeptor 1, was zur Neubildung von Gefäßen führt (Distler 2003). Darüber hinaus nimmt HIF-1 α über iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid - Synthase), HO-1 (induzierbare Hämoxygenase-1), PDGF (*platelete derived growth factor*) und Endothelin-1 Einfluss auf den Gefäßtonus, über die Lactat-Dehydrogenase A und den Glucose-1-Transporter kommt es zur Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel, über Erythropoetin (EPO) zu einer Steigerung der Erythropoese und über die Tyrosinhydroxylase zu einer Verstärkung der Lungenventilation, sowie über IGF-II zu Zellproliferation, - wachstum und Apoptose (Gaber et al. 2005). Jedoch führt nicht nur Hypoxie zur Expression von HIF-1 α , sondern auch Hormone wie Insulin, Cytokine wie TNF- α oder Interleukin 1 β und Wachstumsfaktoren wie TGF- β (Gaber et al. 2005). So ist es möglich nach einer Verletzung bereits nach sechs Stunden in der Maus HIF-1 α mRNA in inflammatorischen Zellen nachzuweisen (Albina et al. 2001). Während der Frakturheilung konnte im Rattenmodell HIF-1 α mRNA ab dem dritten Tag nach dem Trauma nachgewiesen werden mit einem Peak am zehnten Tag (Komatsu und Hadjiargyrou 2004).

1.3.2. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - A

VEGF-A ist ein Herparin-bindendes, 45 kiloDalton schweres Glykoprotein (Ferrara und Smyth 1997). Das menschliche VEGF-Gen ist auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert (Vincenti et al. 1996). Es können durch alternatives Splicen die vier Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ mit unterschiedlicher Aminosäurenlänge entstehen (Houck et al. 1991, Ferrara et al. 1991). Vor allem durch die Stimuli Hypoxie, Cytokine oder Zelldifferenzierung kommt es durch verschiedene Zellen, darunter Blutplättchen, Monozyten, Chondrozyten, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten zur

Expression von VEGF (Ferrara und Smyth 1997, Street et al. 2001). VEGF-Rezeptoren sind Typ III Rezeptor Tyrosin Kinasen (Gupta und Zhang 2005). Wobei VEGF sowohl an den VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1, Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase*)) auf Endothelzellen, Monocyten und Makrophagen bindet, was deren Migration bewirkt, als auch an den VEGFR-2 [Flk-1/KDR (*kinase insert domain containing receptor*)] vor allem auf Endothelzellen, wodurch es zur Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben von Zellen und besonders der Induktion der Angiogenese kommt (Matsumoto und Mugishima 2006). Der Rezeptorbindung und somit Homodimerbildung des Rezeptors, Kinaseaktivierung und Autophosphorylisierung folgt die Induktion der Osteogenese durch eine Erhöhung der Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten und Osteoklasten (Carano und Filvaroff 2003, Street et al. 2002). Andererseits wird durch VEGF die Wandlung des weichen in den harten Kallus und die Mineralisation des neugebildeten Gewebes in der vierten Phase der Knochendefektheilung getriggert (vgl. 1.2.2 Sekundäre Knochendefektheilung). Darüber hinaus kommt VEGF besonders in der Kallusvaskularisierung eine wichtige Rolle zu (Street et al. 2002). Diese erlangt er durch seine Wirkung auf Endothelzellen, indem es deren Rekrutierung, Proliferation, Aktivität und Permeabilität beeinflusst (Ferrara et al. 2003), aber auch durch die Konzentrationserhöhung von Plasminogen Aktivatoren und Interstitieller Kollagenase, die für das Aussprossen neuer Gefäße während der Angiogenese wichtig sind (Distler et al. 2003). Vor allem unter Hypoxie bei geringem pO_2 bspw. in Osteoblasten oder in Nekrosezonen in der Umgebung eines Tumors steigt die Expression der VEGF - mRNA rapide an (Ferrara und Smyth 1997, Steinbrech et al. 2000). Im Rahmen der Knochendefektheilung spielt VEGF vor allem von der zweiten bis vierten Phase auf molekularer Ebene eine Rolle (Gerstenfeld et al. 2003).

1.4. Knochenersatzmaterialien

Materialien, die einen Knochendefekt überbrücken sollen, müssen nach Schieker und Mutschler folgende sechs Kriterien erfüllen: biologische Leistungsfähigkeit, worunter die Osteoinduktion, die Osteokonduktion und die Osteogenese zusammengefasst

werden, aktuelle sowie langfristige mechanische Beanspruchbarkeit, Verfügbarkeit, angemessener technischer Aufwand, eine geringe Patientenmorbidity und Langzeitstabilität. Wobei auch Faktoren wie die Kosten, die Komplikationsrate und die gesamte Behandlungsdauer schlussendlich bei der Wahl berücksichtigt werden müssen (Schieker und Mutschler 2006). Unter dem Begriff der Osteoinduktion versteht man die Fähigkeit eines Materials, Knochenbildung zu induzieren, indem die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten gefördert wird (Hing 2004). Nur autologe Knochentransplantate und demineralisierte Knochenmatrizes besitzen diese Eigenschaft (Boos et al. 2010). Bei anderen Knochenersatzmaterialien kann sie nur durch beispielsweise den Zusatz von DBM (*demineralized bone matrix*), BMPs und Wachstumsfaktoren gefördert werden (Giannoudis et al. 2005). Die Osteokonduktion beschreibt die Eigenschaft des Materials als Matrix für knochenbildende Zellen und einsprossende Gefäße zu dienen, so dass sich auf ihrer Oberfläche der neue Knochen bilden kann (Van der Stok et al. 2011). Diese Eigenschaft ist allen Keramiken und biologischen Materialien eigen und wird durch Calciumsulfate, Calciumphosphatzement, Kollagen oder Synthetische Polymere im Transplantat gewährleistet (Giannoudis et al. 2005). Autologe Transplantate und auch BMA (*bone marrow aspirate*) werden als osteogen bezeichnet, da sie Osteoprogenitorzellen tragen, die sich in Osteoblasten oder Osteocyten weiterentwickeln können (Giannoudis et al. 2005).

1.4.1. Anorganische Knochenersatzmaterialien

Zu den anorganischen Knochenersatzmaterialien zählen Calciumphosphate (CaPO_4), Calciumsulfate (CaSO_4), sowie das aus vier sauren Oxiden bestehende bioaktive Glas (Boos et al. 2010). Da auch der mineralische Hauptbestandteil des menschlichen Knochens Calciumphosphate sind, eignen sie sich als Knochenersatzmaterial (Verron et al. 2010). Je nach Herstellungsvorgang unterscheidet man Zement von Keramik, die beide sowohl aus Calciumphosphaten, als auch Calciumsulfaten aufgebaut sein können (Schieker et al. 2008). Der Prozess der Zemententstehung wird als Sedimentation bezeichnet: ein Pulver wird mit Wasser zu einer Paste vermischt, die direkt in den

Defekt appliziert werden kann und dort bei Körpertemperatur aushärtet (Van der Stok et al. 2011). Bei Keramik handelt es sich um eine Sinterung, die hohe Temperaturen bis über 1100°C benötigt (Dorozhkin 2010). Es werden die beiden synthetischen Keramiken aus Hydroxyapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ und α -/ β -Tricalciumphosphat (TCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, sowie Zusammensetzungen, sogenannte Composites, oder BCPs (*biphasic calcium phosphate*) aus den beiden Materialien unterschieden (Boos et al. 2010). Es gibt jedoch auch biologische Keramiken, bestehend aus Koralle oder boviner Spongiosa, die durch ihre natürlich vorhandene Porosität eine höhere mechanische Stabilität aufweisen, als TCP (Carson und Bostrom 2007). Zur Anwendung kommen diese Materialien in Abhängigkeit von der Größe des zu füllenden Defektes als Granulate, poröse oder dichte Implantate (Carson und Bostrom 2007, Van der Stok et al. 2011). Für eine gute Osteokonduktivität des Materials ist eine Porengröße von 100 - 556 μm ideal (Flatley et al. 1983, Gauthier et al. 1998). Dagegen ist die Mikroporosität mit einer Porengröße $< 10 \mu\text{m}$ wichtig für die Osteoinduktion durch eine Beschichtung mit bspw. Wachstumsfaktoren für eine rasche Substitution durch neuen Knochen (Verron et al. 2010). Ebenso ist die Resorbierbarkeit des Materials, die auch mit der kristallinen Struktur zusammenhängt, relevant. So wird TCP 10- bis 20-mal schneller resorbiert als HA, oder wird in dieses umgewandelt. Wobei HA-Transplantate im Knochen erhalten bleiben und dadurch die Stabilität des physiologischen Knochens durch ihre Brüchigkeit verringern, was in der Folge zu Frakturen führen kann. Durch die Verwendung von Composites, kann das Implantat je nach Verhältnis von TCP : HA und Zweck in seinen Resorptionseigenschaften angepasst werden (Carson und Bostrom 2007).

1.4.2. Organische Knochenersatzmaterialien

Zu den organischen Knochenersatzmaterialien gehören die, gleichfalls als biologische bezeichneten, autologen, allogenen oder xenogenen Transplantate, sowie synthetische, bioabbaubare Polymere und die Biopolymere Kollagen und Gelatine (Boos et al. 2010).

1.4.2.1. Autologe Knochentransplantate

Autologe Knochentransplantate stellen den Goldstandard in der Knochendefektbehandlung dar (Van der Stok et al. 2011), da sie sowohl osteogene, als auch osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften besitzen (Schieker und Mutschler 2006). Sie können sowohl als freies avaskuläres Knochentransplantat als auch mit höherem Aufwand und größeren Komorbiditäten verbunden, vaskularisiert aus dem Beckenkamm, dem distalen Radius, der Ulna und von anderen Stellen direkt vom zu behandelnden Patienten selbst gewonnen werden (Boos et al. 2010). Trotz all seiner Vorteile ist das autologe Knochentransplantat mit einem Risiko von 8-39 % für das Auftreten von Komplikationen verbunden (Van der Stok et al. 2011). Hierzu zählen unter anderem Infektionen, Wundheilungsstörungen, Hämatombildungen, Nervenverletzungen, postoperative und chronische Schmerzen, Reoperationen und andere (Younger und Chapman 1989). Allerdings ist diese Methode nicht geeignet für Patienten der Pädiatrie, der Geriatrie und ebenso wenig für Patienten mit malignen oder infektiösen Erkrankungen, darüber hinaus sind die Spenderstellen limitiert (Van der Stok et al. 2011).

1.4.2.2. Allogene Knochentransplantate

Stammt das Transplantat nicht vom Empfänger selbst, sondern von einem anderen Menschen, spricht man von einem allogenen, früher auch heterologen Gewebetransplantat (Truumees und Herkowitz 1999). Bei diesen allogenen Knochentransplantaten werden zelluläre und weitere antigene Bestandteile mit chemischen Verfahren entfernt, so dass nur die gereinigte, mineralisierte Grundsubstanz mit ihrer Stabilität und porösen Struktur erhalten bleibt. Gleiches gilt für xenogene Knochentransplantate (Schieker et al. 2008). Leider kann die ursprüngliche biomechanische Stabilität vor allem die Rotationsstabilität und Osteoinduktivität durch die chemische Reinigung nicht komplett aufrecht erhalten werden (Pelker et al. 1984, Beebe et al. 2009, Giannoudis et al. 2005). Die begrenzte Verfügbarkeit stellt bei den allogenen anders als bei den autologen Transplantaten kein Problem dar. Jedoch kommt es durch die Gefahr übertragbarer Infektionen wie

Hepatitis B und C, HIV oder bakteriellen Infektionen zu einer Einschränkung (Hou et al. 2005), die durch die EU-Richtlinie 2004/23/EG geregelt wird (Pruss und von Versen 2007).

1.4.2.3. Demineralisierte Knochenmatrix

Durch Säureextraktion von kortikalem Knochen gewinnt man die demineralisierte Knochenmatrix (Truumees und Herkowitz 1999). Wie autologe Präparate besitzt sie osteoinduktive Eigenschaften (Urist 2002), die auf enthaltene Wachstumsfaktoren wie BMP zurückzuführen sind, welche durch die Demineralisierung sogar besser aktiv werden können. Auch die kollagene Struktur bleibt erhalten und dient als osteokonduktive Matrix (Giannoudis et al. 2005). Gleichzeitig bewirkt das chemische Verfahren eine Senkung der Infektiosität und durch die Zerstörung von Zellmembranproteinen die geringste Immunreaktion unter Allografts (Truumees und Herkowitz 1999). Angewandt wird es in verschiedenen Applikationsformen wie Gel, Paste, Granulat und in Kombination mit anderen Transplantaten (Pruss und von Versen 2007).

1.4.2.4. Xenogene Knochentransplantate

Von einem xenogenen Knochentransplantat spricht man, wenn das Spendermaterial von einem Tier stammt (Truumees und Herkowitz 1999). Hierzu zählt die in dieser Arbeit verwendete Rinderspongiosa (Tutobone®). Die Aufbereitung der Präparate entspricht der der Allografts, so dass die poröse Struktur für das Einwachsen von Zellen und die mechanische Stabilität zumindest teilweise erhalten bleiben (Schieker et al. 2008). Es können je nach Verfahren sowohl die organischen als auch die anorganischen oder Zusammensetzungen dieser beiden Bestandteile der Knochentransplantate verwendet werden (Heinemann et al. 2011). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass es durch die Aufbereitung, vor allem durch die hohen Prozesstemperaturen zu einer verringerten Biodegradierbarkeit und einer Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften kommt (Heinemann et al. 2011). Nachteilig ist bei xenogenen

Transplantaten die zusätzliche Gefahr für die Übertragung von Pathogenen, von Zoonosen (Poncelet et al. 2009) und einer starken Immunreaktion (Truumees und Herkowitz 1999).

1.4.2.5. Polymere

Zu den Polymeren zählen sowohl die nicht abbaubaren Polyethylene (PE), die vor allem beim Gelenkersatz bspw. als Überzug von Gelenkpfannen Anwendung finden, als auch Polyethylenterephthalat (PET), Polytetrafluoroethylen (PTFE, Teflon) und Polyurethan (PU), die als Gefäßersatz verwendet werden. Aber auch Silikon, Polypropylen (PP) und Polymethylmethacrylat (PMMA), das als selbstpolymerisierender Zement zur Fixation von Implantaten eingesetzt wird, gehören in diese Gruppe (Heinemann et al. 2011). Zu den biodegradierbaren Polymeren, die als Schrauben, Nahtmaterial oder Netze eingesetzt werden, zählen unter anderem Polyglycolid (PGA), poly-L-Lactid (PLLA), das bei dieser Arbeit verwendet wurde, und poly-D,L-Lactid, sowie Kombinationen dieser (Lichte et al. 2011). Ihre Grundsubstanz sind aliphatische Polyester, die durch Polykondensation von Milchsäure (Polylaktide) bzw. Glykolsäure (Polyglykoline) hergestellt werden (vgl. 1.5) (Schieker et al. 2008). Ihr Abbau vollzieht sich durch hydrolytische Spaltung in die Ausgangssubstanzen, gering durch enzymatischen Abbau sowie durch zelluläre Mechanismen (Lichte et al. 2011). Um die biomechanischen Eigenschaften und die Abbaugeschwindigkeit zu variieren, greift man auf Kopolimerisation, Kombination mit anderen Stoffen, wie Hydroxyapatit, eine Veränderung der Hydrophoben Eigenschaften und der kristallinen Struktur zurück (Lichte et al. 2011, Ignatius et al. 2001). Desweiteren ist ein großer Vorteil der Polymerscaffolds die mögliche Besiedelung mit Zellen, die zu einer schnelleren Knochenneubildung führt (Dupont et al. 2010), oder das Einweben von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie das bei dieser Arbeit verwendete BMP-2 (Schofer et al. 2008a). Als Nachteil dieser biokompatiblen, degradierbaren und formbaren Polymere muss man Immun-, Fremdkörper- und Entzündungsreaktionen auf die verschiedenen, entstehenden Abbauprodukte beachten. Ebenso ist es schwierig, sie zu sterilisieren, da

dieser Vorgang ihre chemischen und biomechanischen Eigenschaften verändert (Heinemann et al. 2011, Ignatius et al. 2001).

1.5. Nanofasern

Der Begriff „Nanofaser“ wird für Fasern mit einem Durchmesser von 1 - 100 nm verwendet (Christenson et al. 2007), wobei auch die Fasern mit einem Durchmesser kleiner als 1000 nm als solche bezeichnet werden, wenn sie durch bestimmte Verfahren wie das Elektrosinning hergestellt wurden (s. 1.5.1 Elektrosinning) (Zhang et al. 2005). Andere Herstellungsverfahren sind neben dem Elektrosinning: das Schmelzblasverfahren, die Phasentrennung (Zhang et al. 2005), *Self-Assembly* (Wang et al. 2010) und die *Template synthesis* (Feng et al. 2002). Als Ausgangssubstanzen für die Nanofaserherstellung dienen biologische Polymere, wie Collagen oder Hyaluronsäure, synthetische Polymere, wie unter 1.4.2.5 bereits beschrieben das PLLA, PGA oder PCL (Poly- ϵ -Caprolactone), sowie Hydroxyapatit, Carbon oder sog. Composites, wie die PCL/HA-Nanofasern (Liao et al. 2006). Das Einsatzgebiet der polymerbasierten Nanofasern ist groß. Sie kommen neben ihrer Anwendung als Fasermatten, sog. *Scaffolds*, im Tissue Engineering, sowohl im biomedizinischen Bereich wie zum Beispiel bei der Wundheilung oder als Implantate, als auch im biotechnologischen Bereich bspw. in Filtersystemen oder bei Biosensoren vor (Zhang et al. 2005). Es sind unter anderem die Polymere PLLA, PGA und PDS (Poly-p-Dioxanone) FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) geprüft (Giavaresi et al. 2004).

Beim Tissue Engineering dienen die aus den Nanofasern hergestellten Matten als Gerüst, ähnlich der natürlichen extrazellulären Matrix (ECM), um die biologische Funktion des Gewebes zu imitieren und die Regeneration zu fördern (Zhang et al. 2005). Sie können neben den Knochendefekten auch bei Knorpel, Blutgefäßen, Nerven und anderen Geweben eingesetzt werden (Zhang et al. 2005).

Um als Matrix für die Geweberegeneration des Knochens fungieren zu können, müssen sowohl die mikro- als auch nanostrukturellen Eigenschaften der organischen und anorganischen Anteile der ECM des Knochens so gut wie möglich von den Scaffolds

imitiert werden, wobei folgende Eigenschaften hierbei eine Rolle spielen (Porter et al. 2009): (1) der Faserdurchmesser, (2) die Porosität und der Porendurchmesser, (3) die Nanostruktur ($< 100\text{ nm}$), (4) die Biodegradierbarkeit, (5) die 3D-Struktur und (6) die Polymerwahl.

(1) Ab einem Faserdurchmesser von $> 2\text{ }\mu\text{m}$ ist ein ungehindertes dreidimensionales Zellwachstum möglich ist (Szentivanyi et al. 2011). Allgemein geht ein größerer Durchmesser der Fasern mit einer zunehmenden Festigkeit des *Scaffolds* und einer höheren mechanischen Stabilität einher (Boudriot et al. 2006). Ein kleinerer Durchmesser weist hingegen eine größere gemeinsame Oberfläche und somit eine höhere Biointegrität, oder beispielsweise eine verringerte Immunantwort auf (Porter et al. 2009, Boland et al. 2004). Wobei bei einem Faserdurchmesser $< 0,25\text{ }\mu\text{m}$ lediglich nur noch eine oberflächliche Zellproliferation und -migration beobachtet werden kann, was jedoch in Relation zum resultierenden Porendurchmesser gesehen werden muss (Szentivanyi et al. 2011). (2) Die Porosität bezeichnet das gesamte Porenvolumen im Verhältnis zum totalen Volumen des Scaffolds, also den Teil des Scaffolds, der für die Zellinfiltration und Gewebeneubildung zur Verfügung steht (Szentivanyi et al. 2011) und die Zellmigration, Vaskularisation, sowie Nährstoffversorgung erlaubt (Porter et al. 2009). Für elektrogesponnene Scaffolds liegt sie im Schnitt bei 70 - 95 % (Szentivanyi et al. 2011). Wobei bedacht werden muss, dass die Zell- und Nährstoffmigration im Gleichgewicht zur strukturellen Integrität und Stabilität stehen muss, die wiederum mit einer Zunahme der Porosität abnimmt (Porter et al. 2009, Hing et al. 2005). Hierbei gibt der Durchmesser der zu kultivierenden Zellen den kleinsten möglichen Porendurchmesser vor (Yang et al. 2001). Der geringste mögliche Porendurchmesser für Zellinfiltration wird häufig mit $10\text{ }\mu\text{m}$ benannt (Szentivanyi et al. 2011, Boland et al. 2004), jedoch zeigte Boland et al. Zellinfiltration bei einem durchschnittlichen Porendurchmesser von nur $1,5\text{ }\mu\text{m}$, was auf die Fähigkeit der individuellen Faserverdrängung in elektrogesponnenen Matten durch die einwachsenden Zellen zurückgeführt wird (Boland et al. 2004). Für das Einwachsen von Osteoid liegt er nach Whang idealerweise bei 40 - $100\text{ }\mu\text{m}$ und für die Knochenneubildung bei 100 – $350\text{ }\mu\text{m}$ (Whang et al. 1999, Yang et al. 2001). Durch die im Mikrometerbereich liegenden Porendurchmesser wird die Osteokonduktivität des Materials gefördert (Porter et al.

2009). So konnte Boudriot *et al.* mit SEM-Aufnahmen (*scanning electron microscopy*) zeigen, dass die Zellen die Poren als Anheftungsstruktur verwenden und ihr Wachstum an den Fasern entlang verläuft (Boudriot *et al.* 2004). **(3)** Die Nanostruktur fördert durch die hier stattfindende Interaktion von Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren die Eigenschaft der Osteoinduktion (Porter *et al.* 2009). Durch Veränderungen in der Oberflächenstruktur oder durch die Beeinflussung der Diffusion von löslichen Stoffen hat die Struktur im Nanometerbereich einen wichtigen Einfluss auf das Zellverhalten in Bezug auf die Anheftung, das Wachstum oder die Differenzierung der Zellen (Muschler *et al.* 2004, Porter *et al.* 2009). **(4)** Die Biodegradierbarkeit ist von den verwendeten Polymeren, der Mikro- und Nanostruktur der Scaffolds und der Umgebung abhängig. So erfolgt ihr Abbau *in vivo* schneller, als *in vitro*, was durch das erhöhte Vorkommen von hydrolytischen Enzymen wie der Lipase bedingt ist (Porter *et al.* 2009). Ebenfalls ist ihr Abbau von ihrer Hydrophobie und ihrer Kristallinität abhängig (Muschler *et al.* 2004). Im Allgemeinen möchte man eine Abbaurate der Scaffolds erreichen, die der Gewebeneubildung und Wachstumsrate der Zellen entspricht, so dass Abbau und Neubildung fließend ineinander übergehen (Li *et al.* 2006). Ebenfalls sollten die entstehenden Abbauprodukte biokompatibel sein (Porter *et al.* 2009). So sind die Abbauprodukte der bei dieser Arbeit verwendeten PLLA-Fasern, die Milchsäure (*lactic acid*), nicht gerade förderlich für die Geweberegeneration, da sie unter anderem zu einer Senkung des pH-Wertes in der Umgebung führen (Li *et al.* 2006). Allerdings kann dies angesichts ihrer hohen Porosität und damit großen Oberfläche im Verhältnis zum zu füllenden Volumen bei den Nanofaserscaffolds vernachlässigt werden (Li *et al.* 2006, Schofer *et al.* 2011a). Über mehrere Jahre hinweg wurde jedoch deutlich, dass die chemische und mechanische Biodegradation des gleichen Polymers stark variiert je nach klinischem Setting, anatomischer Lokalisation oder Spezies (Muschler *et al.* 2004). **(5)** Die beim Elektrosponnen entstehende 3D-Struktur der PLLA-Nanofasern stellte sich, verglichen mit einer 2D-Struktur von bspw. Glas, als ein ideales Gerüst für die Zellvermehrung heraus (Schofer *et al.* 2008b). So sind die Architektur und die räumliche Orientierung der Fasern neben der Porosität ebenfalls für die Adhäsion, Migration und Proliferation der Zellen von Bedeutung (Boudriot *et al.* 2006). **(6)** Bei der Wahl des Polymers für die Scaffolds konnte in einer früheren Arbeit gezeigt werden,

dass PLLA- im Vergleich zu Kollagen-Scaffolds leichter zu produzieren und stabiler sind. Darüber hinaus werden Wachstum und Differenzierung der MSC durch PLLA nicht negativ beeinflusst (Schofer et al. 2009b). In einer Polymervergleichsstudie präsentierte sich auf PLLA-Nanofasern nach der Beschichtung mit Zellen die höchste Zellproliferation unter den Vergleichspolymeren (Li et al. 2006).

Ein weiterer großer Vorteil der PLLA-Nanofaserscaffolds ist die Möglichkeit Wachstums-, Adhäsions- oder Transkriptionsfaktoren in die Fasern zu integrieren, wodurch die osteogenen Eigenschaften der Scaffolds erhöht werden. Hierfür kommen bspw. BMPs, PDGF, IGF-1 und 2, sowie FGF (*fibroblast growth factor*) in Frage, die nach und nach ins Gewebe abgegeben werden um die Heilung und Geweberegeneration zu beschleunigen und gleichzeitig Pathologien vorzubeugen. Vor allem durch die Integration von BMP konnte die Osteoinduktivität gesteigert und eine schnellere Knochenneubildung erreicht werden (Lichte et al. 2011). BMP-2 kann ohne seine Bioaktivität zu verlieren direkt in die Nanofasern inkorporiert werden. Dadurch kommt es zu spindelförmigen Auftreibungen der Fasern, die BMP-2 enthalten, das nach und nach abgegeben wird. Es kommt bei diesen Fasern im Vergleich zu reinen PLLA-Fasern zu einer erhöhten Genexpression von Genen, die mit der Differenzierung zu Osteoblasten einhergeht (Schofer et al. 2008b, Schofer et al. 2011b). Gleichfalls bewirkt es eine Abnahme des Faserdurchmessers und der Porosität. Die Adhärenz der hMSC ist durch die Beschichtung erhöht, ihre Proliferation jedoch heruntergesetzt (Schofer et al. 2011b). Ebenfalls konnte durch die Integrierung von BMP-2 eine erhöhte Osteokonduktivität und eine schnellere Knochenregeneration *in vivo* gezeigt werden (Schofer et al. 2011a). Auch eine erhöhte Genexpression von VEGF konnte nach Inkorporation von BMP-2 nachgewiesen werden (Schofer et al. 2009c).

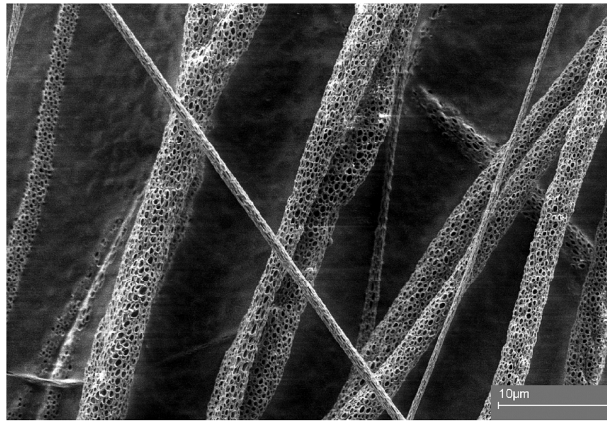


Abbildung 2: Elektrogenessponnene Matrix aus 3,5 % Polylaktid in Dichlormethan (Boudriot et al. 2004)

1.5.1. Elektrosinning

Bereits im Jahr 1934 wurde die Methode des Elektrosinnens von Formhals patentiert und in den folgenden Jahrzehnten bis heute weiterentwickelt (Formhals 1934, Boudriot et al. 2004). Das Verfahren ermöglicht die Herstellung von kontinuierlichen Fasern aus den verschiedensten Polymerlösungen und deren Mischungen bis hin zu Keramiken mit einem Durchmesser von $< 10 \text{ nm}$ bis ca. $1 \text{ }\mu\text{m}$ (Boudriot et al. 2004, Zhang et al. 2005). Je nach Bedarf können Metalle, Keramiken, Enzyme, Wachstumsfaktoren oder Medikamente in die Fasern integriert werden (Greiner und Wendorff 2007, Jia et al. 2002, Su et al. 2012).

Allgemein wird für den Prozess des Elektrosinnens die gewünschte Polymerlösung mittels einer Spritze durch eine Nadel gepresst (Boudriot et al. 2004). Zwischen dieser Nadel und im Abstand von $10 - 25 \text{ cm}$ zu einer Gegenelektrode, die an den sogenannten Kollektor angeschlossen ist, wird ein starkes elektrisches Feld von $100 - 500 \text{ kVm}^{-1}$ angelegt (Greiner und Wendorff 2007). Es entsteht aus dem Tropfen an der Nadelöffnung durch das Verdampfen des Lösungsmittels ein Flüssigkeitsstrahl, auch Jet genannt, der in direkter Richtung zur Gegenelektrode beschleunigt wird. Nach kurzer Zeit ändert der Strahl seine Richtung und formt so in seinem Verlauf einen Kegel mit der Öffnung in Richtung des Kollektors (Greiner und Wendorff 2007). Dort legen sich die Fasern ungeordnet als Matte, den Nanofaserscaffolds, auf der Kollektorplatte ab (Boudriot et al. 2004). Wird eine sich drehende Spindel als Kollektor verwendet, kann

die Anordnung der Nanofasern beeinflusst werden (Matthews et al. 2002). Ebenso kann der Durchmesser, die Porosität, die dreidimensionale Struktur und andere Eigenschaften der Nanofasern durch Änderung im Aufbau des Elektrosinningprozesses entsprechend modifiziert werden (Boudriot et al. 2006).

1.6. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht die verschiedenen Implantatformen Leerdefekt (negative Kontrollgruppe), Rinderspongiosa (Tutobone®), PLLA- und PLLA/BMP-2-Scaffolds, die zum Verschließen eines Critical-Size-Defect in der Calotte von Ratten im Rahmen der Dissertation von Philipp Rößler verwendet wurden (Schofer et al. 2011a), immunhistochemisch auf den zeitlichen Verlauf der Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α und des Wachstumsfaktors VEGF. Hierdurch soll die Rolle der Angiogenese während der Einheilung der Transplantate genauer betrachtet und beurteilt werden inwieweit die Hypoxie bei der Knochendefektheilung der Ratte eine Rolle spielt.

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung der Nanofasern

Eine genauere Charakterisierung, die physikalischen Eigenschaften, sowie die Herstellung von PLLA und PLLA/BMP-2 Scaffolds wurden bereits detailliert beschrieben (Schofer et al. 2009b, Schofer et al. 2008b, Schofer et al. 2011a).

2.2. Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit wie folgt gewonnen: Es wurden 120 fünf Monate alte Sprague-Dawley Ratten herangezogen.

Diese wurden in vier Gruppen zu je 30 Ratten aufgeteilt. Es wurden ihnen bilaterale 5 mm große Critical-Size-Defects (CSD) in der Kalotte gesetzt und mit einem der folgenden Materialien verschlossen: (1) unverschlossen als negative Kontrollgruppe, (2) Rinderspongiosaimplantate als positive Kontrolle (Tutobone®, Tutogen, Neunkirchen am Brand, Germany), (3) PLLA Nanofaser Scaffolds oder (4) PLLA/BMP-2 Nanofaser Scaffolds. Nach einem Heilungszeitraum von 4, 8 oder 12 Wochen wurden jeweils 10 Tiere in jeder Gruppe getötet, um daraufhin die Knochencalotten zu untersuchen. (Schofer et al. 2011a)

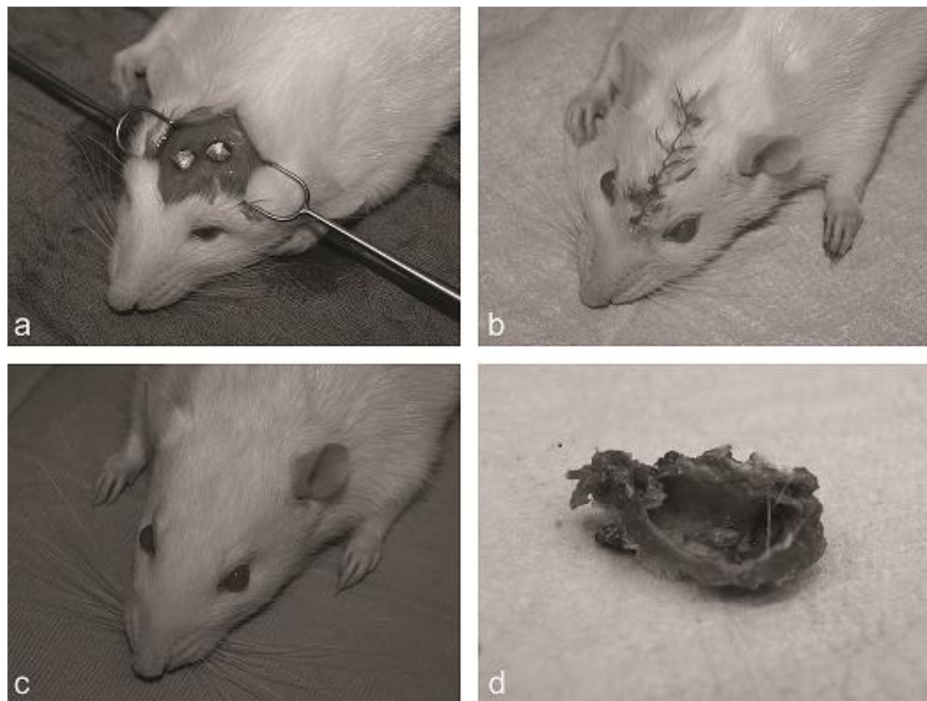


Abbildung 3: Operation und Heilungsverlauf der Sprague-Dawley Ratten a: Setzen der CSD, b: durch Naht verschlossener OP-Bereich, c: vollständig verheilte Wunde, d: OP-Präparat der Calotte vor der Einbettung in Paraffin (Schofer et al. 2011a)

2.3. Immunhistochemie

2.3.1. Anfertigung der Schnittpräparate

Nachdem der Tod der Versuchstiere je nach Gruppe nach 4, 8 oder 12 Wochen durch eine CO₂-Vergiftung herbeigeführt wurde, wurden die Knochendefektareale mit dem

sie umgebenden Knochen, Haut und Bindegewebe nach dem Herausnehmen für drei Tage in 4%-igem Formalin fixiert, um sie anschließend über 18 Tage in einer EDTA Lösung (Osteosoft®, Merck, Darmstadt, Germany) zu dekalzifizieren. Im Anschluss folgten das Zuschneiden der Knochen mit einer Präzisionssäge, die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Zedernholzöl und schließlich ihre Einbettung in Paraffin (Schofer et al. 2011a). Mit einer 40° Klinge (Microtome Blade S35 pfm stainless steel, Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan) wurden am Rotationsmikrotom (RM2055, Leica Microsystems, Bensheim, Germany) Schnitte von 5 µm Dicke zugeschnitten. Diese wurden auf Chromalaun-Adhäsiv (Cr(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat mit Gelatine) beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser, geschnitten, Mattrand, 76 x 26 mm, Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) aufgebracht. Die Präparate wurden direkt im Anschluss beschriftet und über Nacht bei 40°C in einem Trockenschrank getrocknet.

Das Chromalaun-Adhäsiv wurde zuvor bis zur Erreichung einer gesättigten Lösung unter ständigem Rühren bei 40°C durch Lösen von 2,5 g gepulverter Gelatine in 500 ml Aqua dest. hergestellt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2,0 g Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat hinzugegeben, anschließend filtriert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.3.2. Rehydrierung der Präparate

Zunächst wurden die Präparate einer Versuchsreihe mit einer Negativkontrolle in einem Glasschiffchen für 45 min in den 60°C warmen Inkubationsschrank gestellt, um das Paraffin zu schmelzen. Daraufhin kamen die Objektträger unter dem Abzug in die mit Xylol beginnende absteigende Alkoholreihe (s.**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Tabelle 1: Rehydrierung der Präparate in der mit Xylol beginnenden absteigenden Alkoholreihe

Xylol (1)	5 min
-----------	-------

Xylol (2)	5 min
Xylol (3)	5 min
Xylol (4)	5 min
EtOH 100%	2 min
EtOH 100%	2 min
EtOH 96%	2 min
EtOH 96%	2 min
EtOH 80%	2 min
EtOH 70%	2 min
EtOH 50%	2 min
H ₂ O deionisiert	5 min

2.3.3. VEGF

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten immer an zwei aufeinander folgenden Tagen mit einer Inkubation des Primärantikörpers bei 4°C über Nacht.

Tag 1

Während der Dauer der Rehydrierung wurden die 1:100 Primärantikörperverdünnung mit 1980 µl Dako Antibody Diluent (Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components, S3022, Dako, Carpinteria, USA) und 20 µl VEGF-AK (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Ab-1, RB-222-P, Thermo Fisher Scientific, Warm Springs, USA) sowie der Serumblock mit 2'000 µl PBS (phosphate buffered saline nach Sambrook, J., pH 7,4) und 30 µl des entsprechenden Serums aus Rabbit ABC-AP Kit (Vectastain, Vector-laboratories, Burlingame, USA) angesetzt. Im Anschluss an die Alkoholreihe folgte die Reinigung der Präparate in deionisiertem Wasser für 5 min und die Umrandung mit einem PAP-Pen (Dako Pen, S2002, Dako, Carpinteria, USA), um das Feuchtbleiben zu gewährleisten. Wie in Tabelle 2 aufgeführt, folgte dem Serumblock, das zweifache Reinigen in 1-fach konzentrierter TBS (Tris-Hydroxymethylaminomethan)-Puffer-Lösung (pH 7,6) in einem Glasstandzylinder, dann die Avidin-

/Biotin-Blockade (Avidin/Biotin Blocking Kit, SP-2001, Vector Laboratories, Burlingame, USA), ebenfalls mit einer zwischengeschalteten TBS-Waschung. Danach wurden 150 µl des Primärantikörpers auf 12 Präparate oder 150 µl Dako Antibody Diluents (Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components, S3022, Dako, Carpinteria, USA) auf das für die Negativkontrolle vorgesehene Präparat pipettiert.

Tabelle 2: Färbeprotokoll für VEGF Tag 1

Serum Block (Normalserum Goat)	20 min	150 µl
2xTBS	4 min	
Avidin-Blockade	15 min	1 Tropfen
2xTBS	4 min	
Biotin-Blockade	15 min	1 Tropfen
2xTBS	4 min	
Primär-AK/Diluent für Negativktrl.	4°C ü.N.	150 µl

In kleinen Feuchtkammern verschlossen kamen die prozessierten Präparate bei 4°C über Nacht in den Kühlschrank.

Tag 2

Nach 60 min an der Raumtemperatur wurden die Präparate in TBS-Puffer-Lösung zweimal gereinigt. Dann wurden 150 µl des 1:200 verdünnten biotinylierten Sekundärantikörpers (10 µl biotinylierter Sekundärantikörper (Vector Rabbit Kit ABC-AP) mit 1980 µl 1-fach konzentrierter PBS-Pufferlösung (pH 7,4) verdünnt) auf die Präparate pipettiert. Nach 30 min folgten wie in Tabelle 3 aufgeführt wiederum ein Reinigungsschritt und dann das Aufbringen der Alkalischen Phosphatase. Diese wurde 30 min vor Gebrauch in einer Verdünnung von 1:100 angesetzt und von Licht abgeschirmt. Für die Verdünnung wurde 2500 µl TBS mit 25 µl AP-A desselben Vector Kit ABC-AP wie der Sekundärantikörper durchmischt und dann 25 µl AP-B zugefügt und wieder verschüttelt. Nach der alkalischen Phosphatase Reaktion wurde wieder

zweimal mit TBS gewaschen und anschließend das Vector-Rot auf die Objektträger aufgetropft. Dieser Farbstoff wurde maximal 15 min vor dem Auftragen im Dunkeln mit Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I (SK-5100, Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) wie folgt angesetzt: Zu 2,5 ml Tris-HCL Pufferlösung (pH 8,2) wurde 1 Tropfen Reagenz 1 gegeben, vermischt, dann 1 Tropfen Reagenz 2, wieder vermischt, dann 1 Tropfen Reagenz 3 und wiederum vermischt. Kurz vor dem Auftragen wurde 25 µl Levamisole (Levamisole Solution, SP-5000, Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) hinzugegeben und ebenfalls kurz auf dem Vortex geschüttelt. Hiervon wurde je 150 µl auf die Präparate aufgebracht. Zur Lichtabschirmung wurden die Feuchtkammern mit Plastikdeckeln abgedeckt. Um die Färbung zu überwachen, wurden immer wieder einzelne Präparate während der Einwirkung unterm Mikroskop betrachtet. Abhängig von der resultierenden Farbintensität wirkte das Vector Rot bis zu 25 min ein. Danach kamen die Präparate je nach Intensivität der Färbung nacheinander in deionisiertes Wasser. Sie wurden anschließend einmal für 5 min in TBS-Tween (1L Tris-HCL-Puffer 1x (pH 7,6) mit 1ml 0,1% Tween® 20 for electrophoresis, Sigma®, USA) gereinigt, dann nochmals 2 min in deionisiertem Wasser und schließlich erfolgte die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) 1:50 für 10-30 Sekunden. Abschließend erfolgte das Bläuen für 5 min unter fließendem Leitungswasser.

Tabelle 3: Färbeprotokoll für VEGF Tag 2

2xTBS	4 min	
Biotinylierter Sekundär-AK (Vector Rabbit Kit ABC-AP)	30 min	150 µl
2xTBS	4 min	
Alkalische Phosphatase-ABC	30 min	150 µl
2xTBS	4 min	
AP-Substrat (Vector-Rot)	20 min	150 µl

H ₂ O deionisiert		Färbungskontrollen unter dem Mikroskop
TBS-Tween 20	5 min	
H ₂ O deionisiert	2 min	
Hämatoxylin	10-30 s	
Unter fließendem Leitungswasser bläuen	5 min	

2.3.4. HIF-1 α

Tag 1

Die Färbung der Präparate mit dem Primärantikörper HIF-1 α Ab-4 (Hypoxia-Inducible Factor-1alpha AB-4 (Clone H1alpha67) Mouse Monoclonal Antibody, MS-1164-P0, Lab Vision Corporation, Warm Springs Blvd. Fremont, USA) unterscheidet sich in einigen Punkten von der mit VEGF.

Wie unter 2.3.3

VEGF Tag 1 beschrieben, werden die Präparate einer Versuchsreihe in einem Glasschiffchen erwärmt und dann in die absteigende Xylol-Alkohol-Reihe (Tabelle 41) zur Rehydrierung überführt.

Tabelle 4: Färbeprotokoll für HIF-1 α Tag 1

EtOH 50%	2 min
2x H ₂ O deionisiert	5 min
2x TBS-T	5 min
Serum Block (Normalserum Horse) 1:50	30 min
Primär-AK/Diluent für negativ Ktrl. 1:50	4°C über Nacht

Es folgte nach dem 50%-igen Alkohol zwei Reinigungsschritte in deionisiertem Wasser, dann jedoch bereits vor dem Auftragen des Normalserums die zweifache Reinigung in TBS-Tween20. Der Serumblock geschah in einer Verdünnung von 1:50 aus 1960 µl PBS-Puffer (pH 7,4) und 40 µl Normalserum Horse aus dem Mouse ABC-Kit-AK-5002 (Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L) Rat adsorbed affinity purified, made in horse, BA-2001, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Auf jedes mit einem PAP-Pen umrandete Präparat wurden 150 µl aufpipettiert. 30 min nach dem Auftragen wurde die Flüssigkeit auf den Präparaten kurz abgeklopft. Anschließend wurde je 150 µl des Primärantikörpers HIF-1α in einer Verdünnung von 1:50 mit Dako Antibody Diluent aufgebracht. Abschließend wurden die Feuchtkammern verschlossen und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Tag 2

Nach dem Angleichen der Präparate von 4°C bis auf Raumtemperatur, folgte das zweimalige Waschen in TBS-T für 5 min. Dann wurde je 150 µl biotinylierter Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 aufpipettiert. Er setzte sich zusammen aus 1980 µl PBS-Puffer und 20 µl biotinyliertem Antikörper aus dem ABC-Kit-AK-5002. Darauf folgte nach der Reinigung in TBS-T die alkalische Phosphatase, die wie unter 2.3.3 VEGF beschrieben hergestellt wurde. Im Unterschied zur VEGF-Färbung wurde danach zweimal mit 1-fachem PBS-Puffer gereinigt und dann das Vector-Rot aufgebracht. Hierauf folgte dreimal eine Reinigung in deionisiertem Wasser, bevor die Präparate zur Gegenfärbung für 15 Sekunden in Hämatoxylin getaucht wurden (s. Tabelle 5). Die weiteren Schritte der Dehydrierung sind mit denen der VEGF-Färbung identisch (2.3.5. Dehydrierung der Präparate).

Tabelle 5: Färbeprotokoll für HIF-1α Tag 2

bei Raumtemperatur	60 min	
--------------------	--------	--

2xTBS-T	5 min	
biotinylierter Sekundär-AK (Mouse ABC-Kit-AK-5002) 1:200	30 min	150 µl
2xTBS-T	5 min	
Alkalische Phosphatase-ABC	30 min	150 µl
2xPBS 1fach	5 min	
AP-Substrat (Vector-Rot)	20 min	150 µl
3x H ₂ O deionisiert	2 min	Färbekontrollen unter dem Mikroskop
Hämatoxylin	10-30 s	
Bläuen unter fließendem Leitungswasser	5 min	

2.3.5. Dehydrierung der Präparate

Zur Dehydrierung kamen sowohl für die VEGF-, als auch für die HIF-Präparate in Glasschiffchen in die aufsteigende Alkohol-Xylol-Reihe (Tabelle 6). Anschließend wurden sie mit Vecta Mount Permanent Mounting Medium (permanent mounting medium, Vector lab inc., Burlingame, USA) beschichtet, mit Deckgläsern (Menzel-Gläser, 24 x 40 mm, Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) versehen und mit Bleistift auf der Mattseite entsprechend beschriftet.

Tabelle 6: Aufsteigende Alkohol-Xylol-Reihe zur Dehydrierung der VEGF- und HIF-Präparate

EtOH 50%	10 sec
EtOH 70%	10 sec
EtOH 80%	10 sec

EtOH 96%	10 sec
EtOH 100%	10 sec
EtOH 100%	10 sec
Xylol (5)	2 min
Xylol (6)	2 min
Xylol (7)	2 min
Aufkleben der Deckgläser mit Vecta Mount Permanent Mounting Medium	

2.3.6. Histologische Auswertung

Zur histologischen Auswertung wurden nach der immunhistochemischen Färbung von einem Tier durchgehend je Präparat sechs Ausschnitte ausgewählt, drei im Defektbereich, als auch drei im Bereich von neu gebildetem Knochen. In diesen Bereichen wurden mit dem digitalen Mikroskop (D5000, Leica Microsystems, Bensheim, Germany) in 40-facher Vergrößerung und der Analysen Software QUIPS (Leica Microsystems, Bensheim, Germany) die positiven Zellen und die Gesamtzahl aller Zellen gezählt. Diese wurden dann ins Verhältnis zueinander gesetzt (positive Zellen/Gesamtanzahl) x 100.

2.3.7. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (SPSS statistics 17.0, IBM Deutschland GmbH, Ehningen). Die Daten sind als Mittelwert mit einer +/- Standardabweichung (SD) dargestellt. Von einer Signifikanz wird ab $p < 0.05$ gesprochen. Um Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten zu analysieren, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ONEWAY ANOVA (Analysis of

Variance)) durchgeführt. Daran anschließend wurden über den Bonferroni Post-Hoc-Test Unterschiede der einzelnen Gruppen zueinander betrachtet.

3. Ergebnisse

Die verschiedenen Implantatformen Leerdefekt, Rinderspongiosa, PLLA- und PLLA/BMP-2 der 117 überlebenden Versuchstiere (Schofer et al. 2011a) wurden im zeitlichen Verlauf auf die Expression der Wachstumsfaktoren HIF-1 α und VEGF immunhistochemisch untersucht, um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Knochendefektheilung und einer Hochregulation von HIF-1 α oder VEGF besteht. Es fand keine Charakterisierung der positiven Zellen statt.

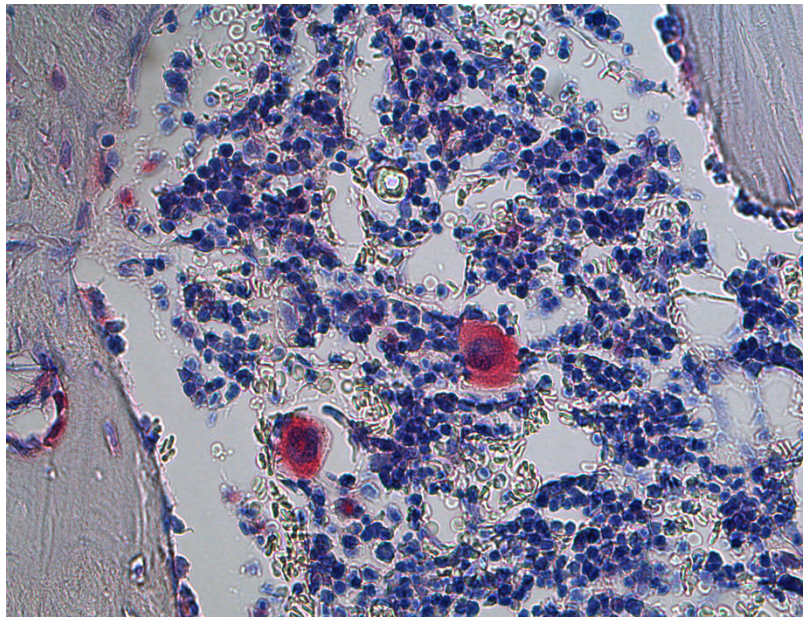


Abbildung 4: Positivkontrolle, VEGF-positive Mastzellen im Knochenmark (40-fache Vergrößerung)

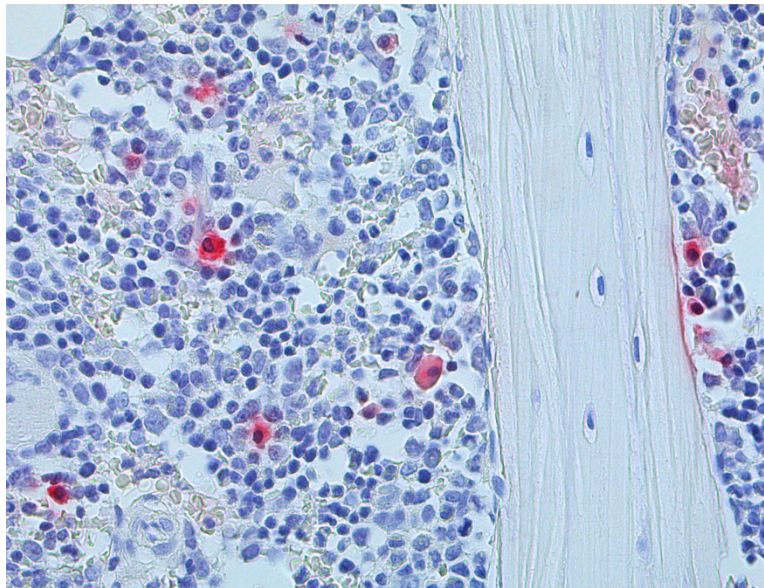


Abbildung 5: HIF-1 α positive Zellen im Knochenmarkraum

Bei der Untersuchung der Tiere auf die Knochenneubildung hin (Schofer et al. 2011a), zeigte sich bei den Tieren, die mit Rinderspongiosa, PLLA- oder PLLA/BMP-2-Scaffolds versorgt wurden, bei Palpation der Eingriffsstelle eine feste Verwachsung der Implantate, wohingegen die negative Kontrollgruppe nur eine weiche, fibröse bindegewebsartige Membran erkennen ließ. Eine Knochenneubildung zeigte sich bei den mit Spongiosa und PLLA/BMP-2 behandelten Tieren, bei den Leerdefekt- und PLLA-Gruppen erfolgte keine Knochenneubildung. (Schofer et al. 2011a)

3.1. Deskriptive Betrachtung der Immunhistochemie

3.1.1. Nachweis VEGF positiver Zellen im Defektareal

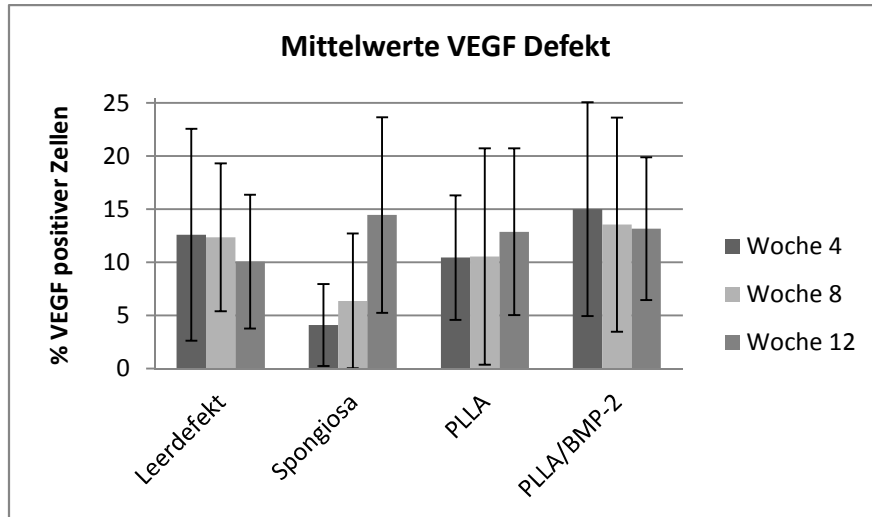


Abbildung 6: Mittelwerte VEGF Defekt: Anzahl der VEGF-positiven Zellen im Verhältnis zu den VEGF-negativen Zellen im Verlauf von 4 bis 12 Wochen, ausgezählt in 40-facher Vergrößerung

Eine Betrachtung aller Ergebnisse zeigt keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 6), weshalb von einer basalen VEGF-Expression ausgegangen wird.

In der Detailbetrachtung werden kleinere, klinisch jedoch nicht relevante Unterschiede sichtbar: Prüft man die Defektheilung der Critical-Size-Defekte (CSD) ohne Füllung (Leerdefekt) im Rattenschädel, so finden sich $12,6 \pm 9,9$ VEGF-positive Zellen nach 4 Wochen, diese Zahl nimmt im zeitlichen Verlauf leicht ab auf $10,1 \pm 6,3$ VEGF-positive Zellen nach zwölf Wochen. Nach der Implantation von Spongiosa finden sich in den Defektarealen nur $4,1 \pm 3,8$ VEGF-positive Zellen nach vier Wochen (s. Abbildung 6). Die Anzahl steigt im zeitlichen Verlauf langsam ($6,4 \pm 6,3$ nach acht Wochen) und weist in der zwölften Woche die meisten positiven Zellen mit $14,5 \pm 9,2$ in diesem Zeitraum von allen Gruppen auf (s. Abbildung 9). Es ergibt sich zwischen der Spongiosa Gruppe und der PLLA/BMP-2 Gruppe eine statistische Signifikanz ($p = 0,019$) nach acht Wochen. Die Expression in den mit PLLA-Nanofasern verschlossenen Defekten startet

bereits in der vierten Woche mit der doppelten Anzahl positiver Zellen wie die Spongiosa Gruppe ($10,5 \pm 5,9$) (s. Abbildung 8) und deutet dann ebenfalls noch einen leichten Anstieg in der zwölften Woche ($12,9 \pm 7,9$) an. Bei der PLLA/BMP-2 Gruppe ist über den gesamten Zeitraum die höchste Expression VEGF-positiver Zellen zu finden (s. Abbildung 10). Sie startet, anders als die anderen drei Gruppen, direkt nach vier Wochen mit ihrem Maximum von $15 \pm 10,1$, was dem Dreifachen der Spongiosa-Gruppe zu diesem Zeitpunkt entspricht. Dann zur zwölften Woche hin fällt die Anzahl leicht ab ($13,2 \pm 6,7$). Es ergab sich in der achten Woche zwischen allen vier Gruppen eine Signifikanz ($p = 0,017$).

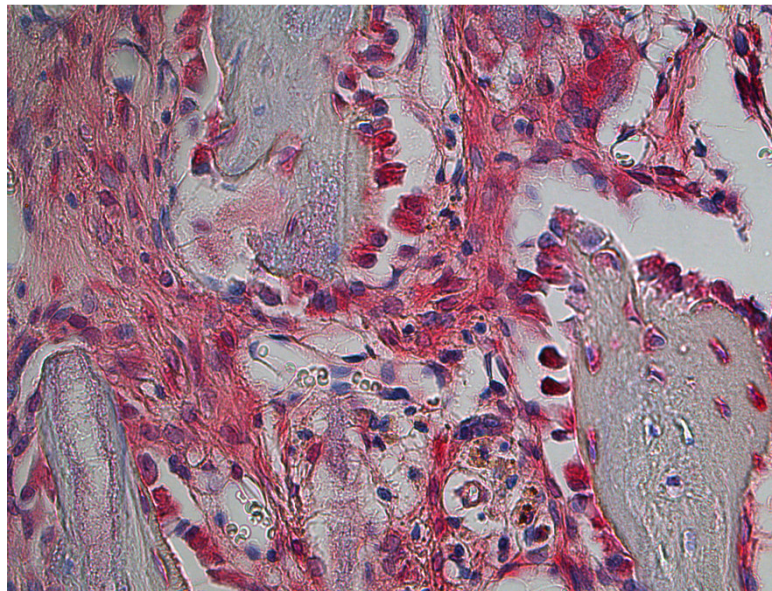


Abbildung 7: VEGF-positive Zellen im CSD-Bereich in der Kontroll-Gruppe nach 4 Wochen (40-fache Vergrößerung)

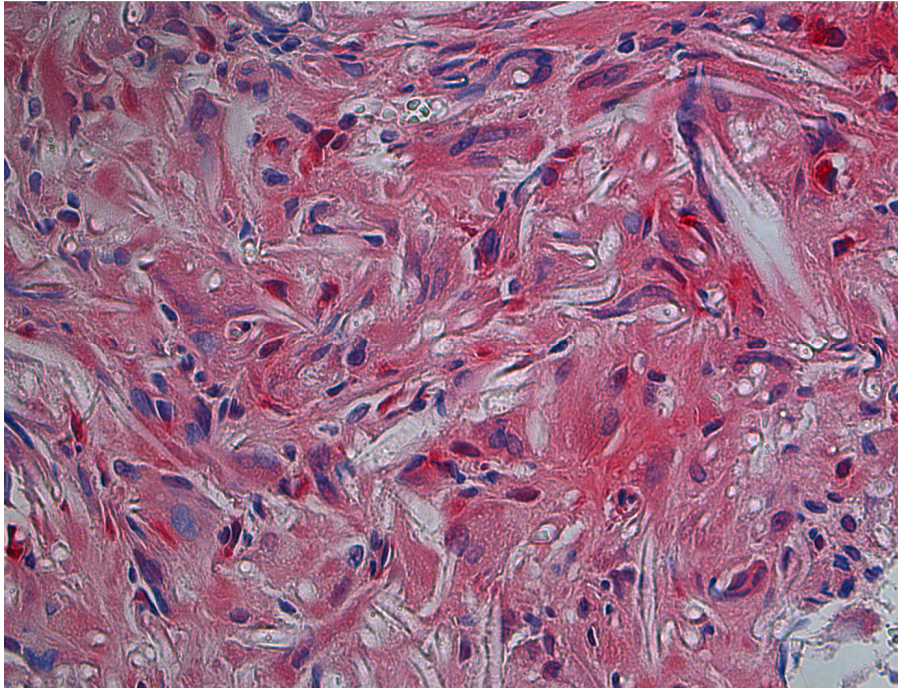


Abbildung 8: VEGF-positive Zellen im CSD-Bereich in der PLLA-Gruppe nach 4 Wochen: Die Faserstruktur ist deutlich auf dem ganzen Ausschnitt erkennbar (40-fache Vergrößerung)

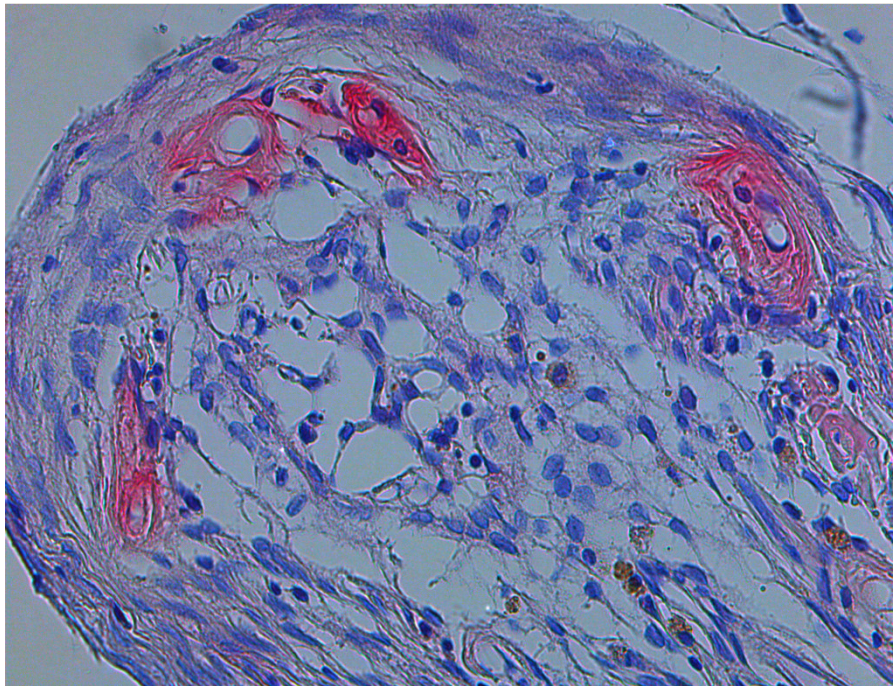


Abbildung 9: VEGF-positive Zellen im CSD-Bereich in der Spongiosa-Gruppe nach 8 Wochen: Die positiven Zellen finden sich in diesem Präparat in der Nähe kleiner Blutgefäße am Rande zur Rinderspongiosa hin (40-fache Vergrößerung)

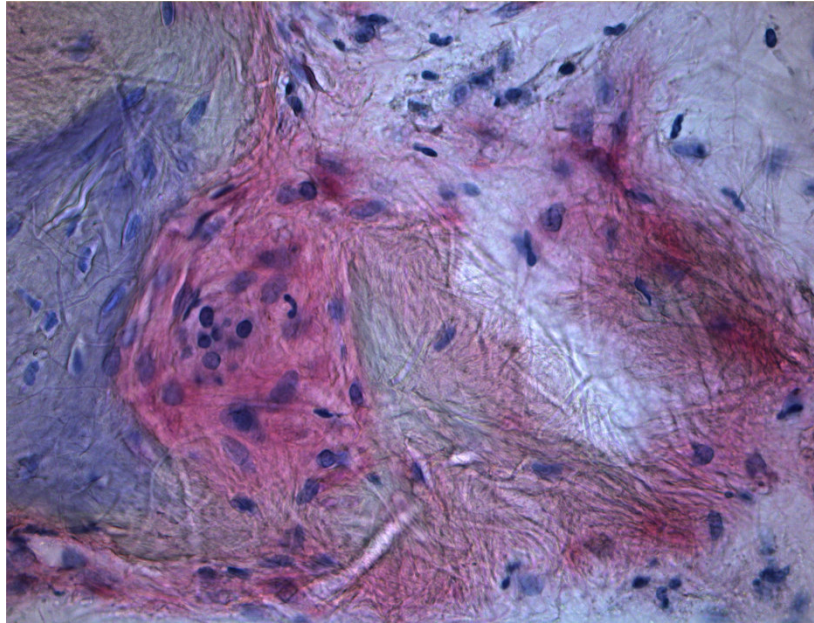


Abbildung 10: VEGF-positive Zellen im CSD-Bereich in der PLLA/BMP2-Gruppe nach 12 Wochen im linken Bildrand ist neugebildeter Knochen sichtbar, der jedoch keine positiven Zellen mehr aufweist (40-fache Vergrößerung)

3.1.2. Nachweis VEGF positiver Zellen in neugebildetem Knochen

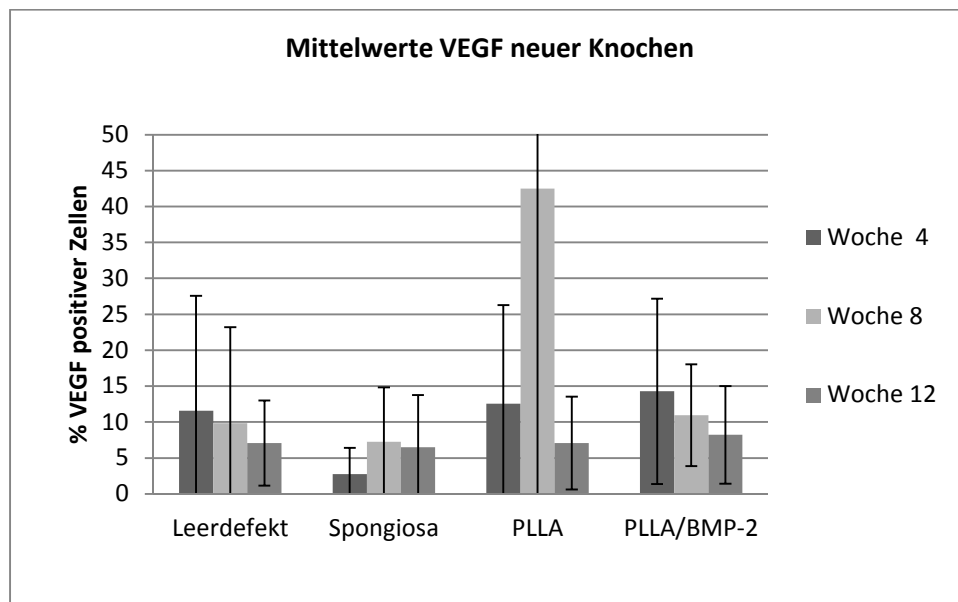


Abbildung 11: Mittelwert VEGF in neugebildetem Knochen: Anzahl der VEGF-positiven Zellen im Verhältnis zu den VEGF-negativen Zellen im Verlauf von 4 bis 12 Wochen, ausgezählt in 40-facher Vergrößerung.

Im Überblick konnten auch hier keine großen Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden, weshalb ebenfalls von einer Basalexpression ausgegangen wird.

Vergleicht man den Anteil VEGF positiver Zellen in neugebildeten Knochenarealen über den gesamten Zeitraum (Abbildung 11), so wird deutlich, dass sie mit 3 – 14 % unter dem Anteil in den Defektarealen liegt. Die PLLA-Gruppe fällt mit dem Vierfachen der anderen Gruppen bei der Gesamtbetrachtung auf, was vermutlich auf eine große Varianz zwischen den Tieren (*Interpatient variability*) zurückzuführen ist.

In der negativen Kontrollgruppe (Leerdefekt) nimmt die Anzahl der VEGF-positiven Zellen von Woche vier ($11,6 \pm 16,0$) bis Woche zwölf ($7,1 \pm 5,9$) etwas ab (s. Abbildung 13). Anders in der Spongiosa-Gruppe sie beginnt mit $2,7 \pm 3,7$ VEGF-positiven Zellen nach vier Wochen - einem Fünftel im Vergleich zur Kontrollgruppe - und verdoppelt bis Woche acht den Anteil an positiven Zellen auf $7,3 \pm 7,6$. In der zwölften Woche fällt sie dann wieder leicht auf $6,5 \pm 7,3$ ab. Durch den geringen Anteil nach der vierten Woche, ergibt sich eine statistische Signifikanz zur PLLA- ($p = 0,035$), als auch zur PLLA/BMP-2 Gruppe ($p = 0,006$), die jeweils das vier- oder fünffache an positiven Zellen aufweisen. In der mit PLLA-Nanofasern versorgten Gruppe ist ein erhöhtes Vorkommen bei Woche acht ($42,5 \pm 104,6$) auffallend, wobei das Vorkommen in Woche vier ($12,6 \pm 13,7$) und zwölf ($7,1 \pm 6,5$) sich nicht von den anderen Gruppen unterscheidet (s. Abbildung 12, Abbildung 16). Die PLLA/BMP-2 Gruppe verhält sich wie die negative Kontrollgruppe und zeigt ein Abnehmen positiver Zellen von Woche vier ($14,3 \pm 12,9$) zu Woche zwölf ($8,2 \pm 6,8$), mit jedoch 1 – 3 % mehr positiver Zellen (s. Abbildung 14, Abbildung 15). Es findet sich hier eine Signifikanz ($p = 0,006$) der PLLA/BMP-2 Gruppe und der Spongiosa Gruppe nach vier Wochen.

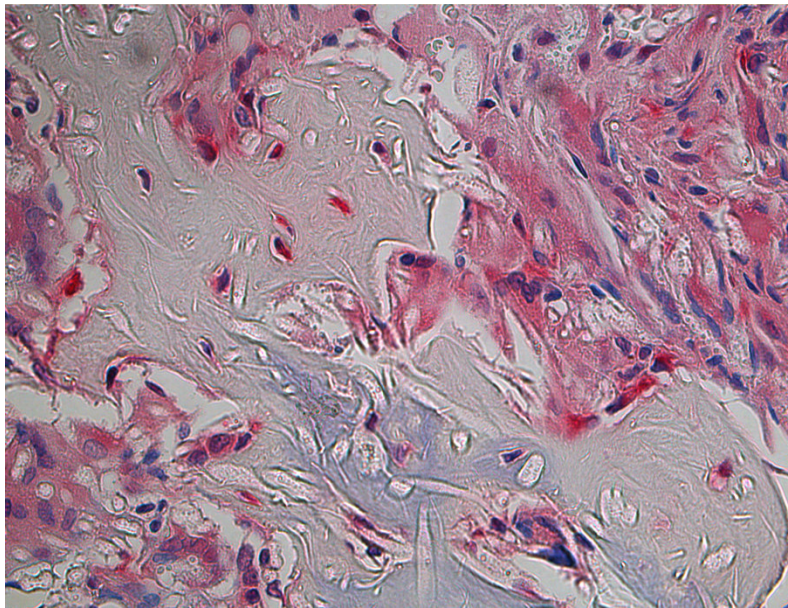


Abbildung 12: VEGF-positive Zellen in neugebildetem Knochen in der PLLA-Gruppe nach 4 Wochen; erkenntlich sind in dem neugebildeten Knochengewebe, die Struktur der Nanofasern und rechts oben Defektgewebe (40-fache Vergrößerung)

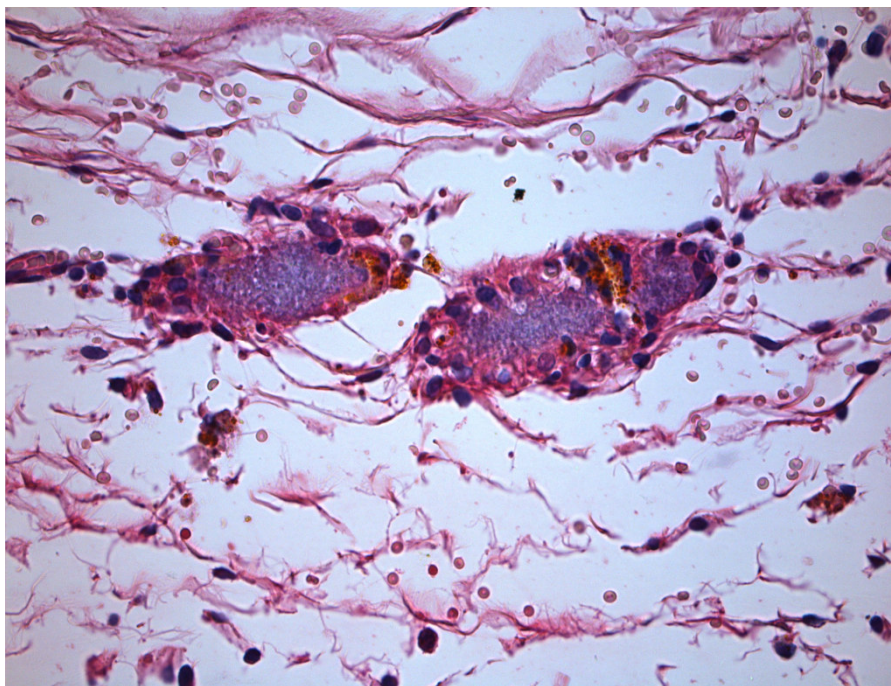


Abbildung 13: VEGF-positive Zellen um kleine Knochenneubildungen herum in der Leerdefekt-Gruppe nach 8 Wochen (40-fache Vergrößerung)

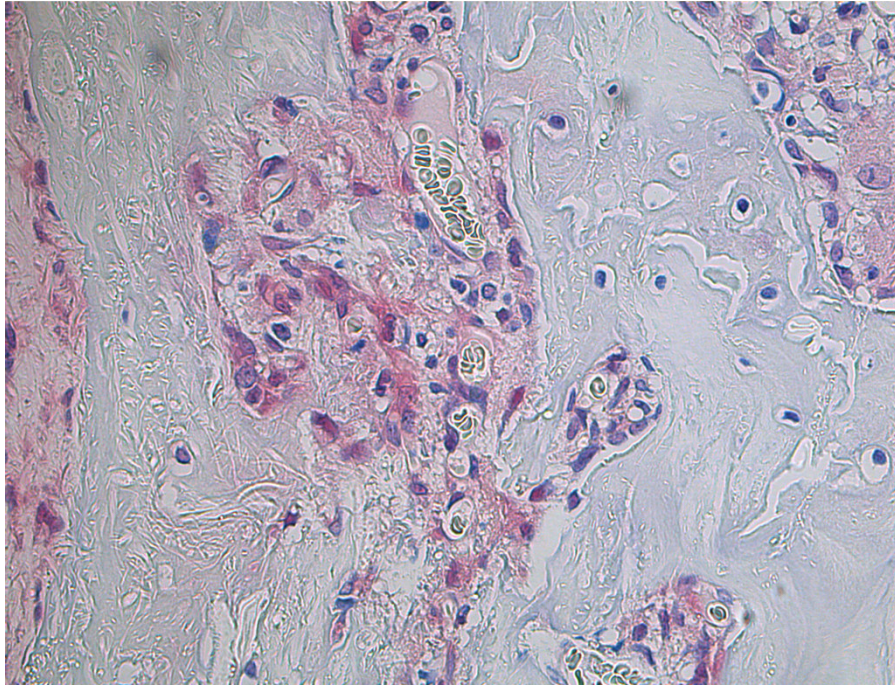


Abbildung 14: VEGF-positive Zellen in neugebildetem Knochen in der PLLA/BMP2-Gruppe nach 8 Wochen, mittig und im unteren Ausschnitttrand sind Erythrozyten sichtbar (40-fache Vergrößerung)

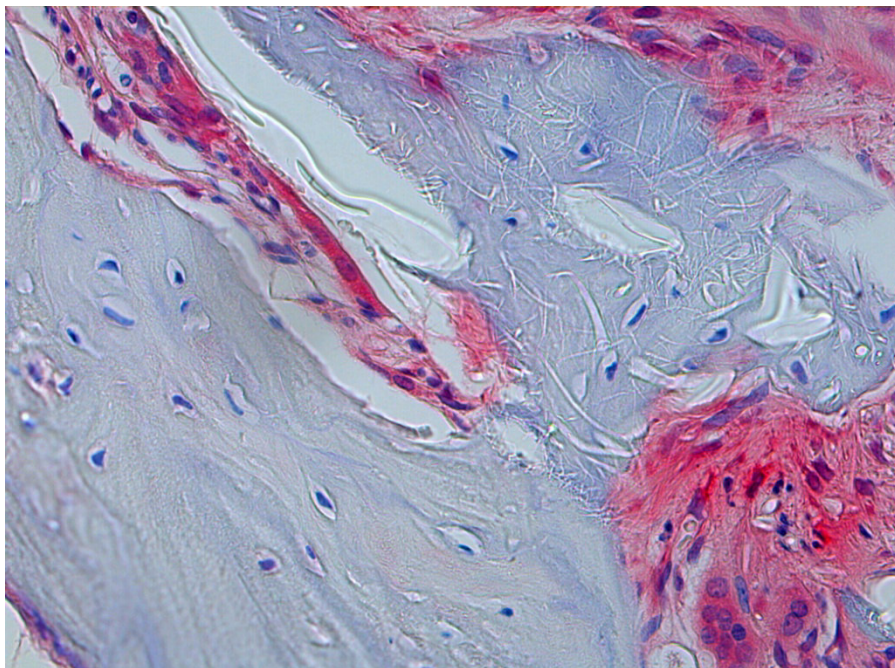


Abbildung 15: VEGF-positive Zellen in neugebildetem Knochen in der PLLA/BMP2-Gruppe nach 12 Wochen; im linken Bildteil nehmen die Knochenzellen keinerlei Farbe auf, rechts oben ist im neuen Knochen noch die Faserstruktur sichtbar, im rechten unteren Areal und links oben eine deutliche Positivfärbung, jedoch noch nicht vollständig regenerierter Knochen (40-fache Vergrößerung)

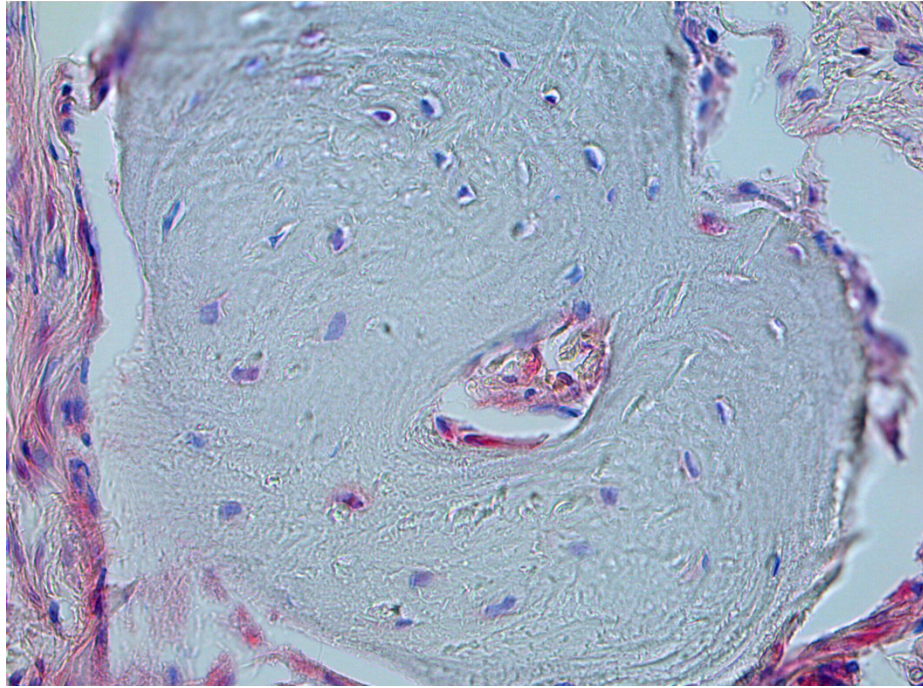


Abbildung 16: VEGF-positive Zellen in neugebildetem Knochen in der PLLA-Gruppe nach 12 Wochen; Im fertigen Knochen selbst sind nur einzelne positive Zellen erkennbar, im anschließenden Defektgewebe deutlich mehr positive Zellen (40-fache Vergrößerung)

3.1.3. Nachweis von HIF-1 α positiven Zellen im Defektareal

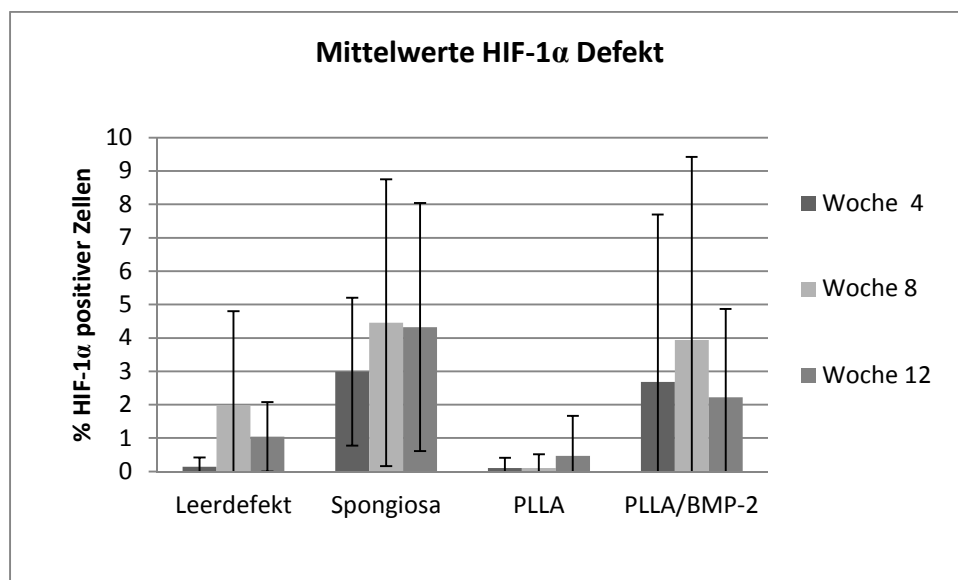


Abbildung 17: Mittelwert der HIF-1 α -positiven Zellen im Verhältnis zu den HIF-1 α -negativen Zellen im CSD-Bereich im Verlauf von 4 bis 12 Wochen, ausgezählt in 40-facher Vergrößerung

In allen Präparaten zeigten sich durchweg keine großen HIF-1 α positiven Areale. Es traten nur vereinzelte positive Zellen mit 0 - 4 % der Gesamtzahl aller Zellen auf. Somit erreicht die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α in den Defektarealen über den gesamten Zeitraum maximal ein Drittel der VEGF-Expression. Statistisch konnten mehrere Signifikanzen nachgewiesen werden. Betrachtet man jedoch die zugehörige, sehr geringe Zellzahl, wird deutlich, dass hierin keine klinische Relevanz besteht. Des Weiteren zeigten sich große Schwankungen zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 17).

Die Detailbetrachtung zeigt Folgendes: In der negativen Kontrollgruppe (Leerdefekt) ist das Auftreten positiver Zellen in Woche vier gering ($0,2 \pm 0,3$), steigt in Woche acht auf ihr Maximum von $2,0 \pm 2,9$ und sinkt dann in Woche zwölf auf $1,0 \pm 1,0$ ab. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach vier Wochen findet sich eine Signifikanz ($p = 0,006$) zur Spongiosagruppe, ebenso zur PLLA/BMP-2 Gruppe ($p = 0,019$). In der Spongiosa-Gruppe werden im Gesamten die meisten positiven Zellen exprimiert (s. Abbildung 18, Abbildung 21, Abbildung 22). Im zeitlichen Verlauf erkennt man das gleiche Auftrittsmuster wie in der negativen Kontrollgruppe, jedoch mit doppelt so hohem Anteil positiver Zellen: das geringste Auftreten zum Zeitpunkt von vier Wochen ($3,0 \pm 2,2$), dann das Maximum bei acht Wochen ($4,5 \pm 4,3$) und eine geringe Abnahme in der zwölften Woche ($4,3 \pm 3,7$). Es zeigt sich hier verglichen mit der PLLA-Gruppe nach vier Wochen eine Signifikanz ($p = 0,003$), ebenfalls nach acht Wochen ($p = 0,001$). Nach zwölf Wochen tritt als einzige Signifikanz ($p = 0,028$) in diesem Zeitraum eine zur PLLA/BMP-2-Gruppe auf, die zu diesem Zeitpunkt nur die Hälfte positiver Zellen zeigt. Bei den mit PLLA-Nanofasern behandelten Ratten ist die HIF-1 α -Expression unabhängig von der Zeit sehr gering, sogar beinahe gegen null gehend. Hier liegen die Werte nach vier und acht Wochen auf gleichem Niveau ($0,1 \pm 0,3$), steigen nach 12 Wochen gering an ($0,5 \pm 1,2$), bleiben jedoch weit hinter den Maxima der anderen Gruppen. Diese Gruppe weist außer den bereits erwähnten nach vier Wochen ($p = 0,012$), des Weiteren nach acht Wochen ($p = 0,004$) einen statistisch signifikanten Unterschied mit der PLLA/BMP-2 Gruppe auf. Die PLLA/BMP-2 Gruppe weist nach der

Leerdefektgruppe die höchste Gesamtanzahl positiver Zellen auf (s. Abbildung 19, Abbildung 20). Sie zeigt ebenfalls wie in der Leerdefekt- und Spongiosagruppe einen Anstieg nach Woche vier ($2,7 \pm 5,0$) und zu ihrem Maximum nach Woche acht ($3,9 \pm 5,5$), fällt dann jedoch im Unterschied zu den anderen Gruppen nach der zwölften Woche auf ihr Minimum ($2,2 \pm 2,7$), das der Hälfte der Anzahl an positiven Zellen in der Spongiosa-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt entspricht.

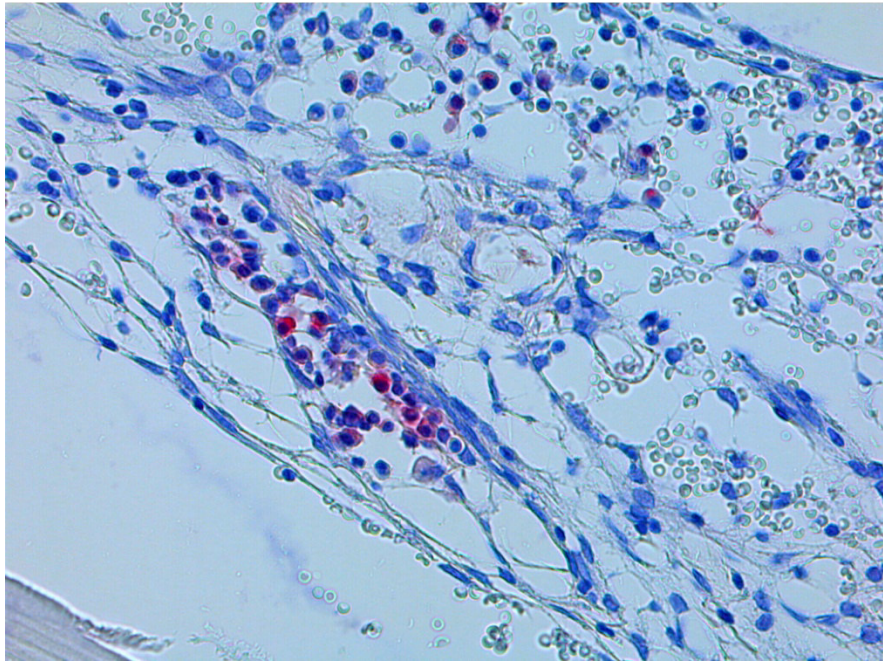


Abbildung 18: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich in der Spongiosa-Gruppe nach 4 Wochen (40-fache Vergrößerung)

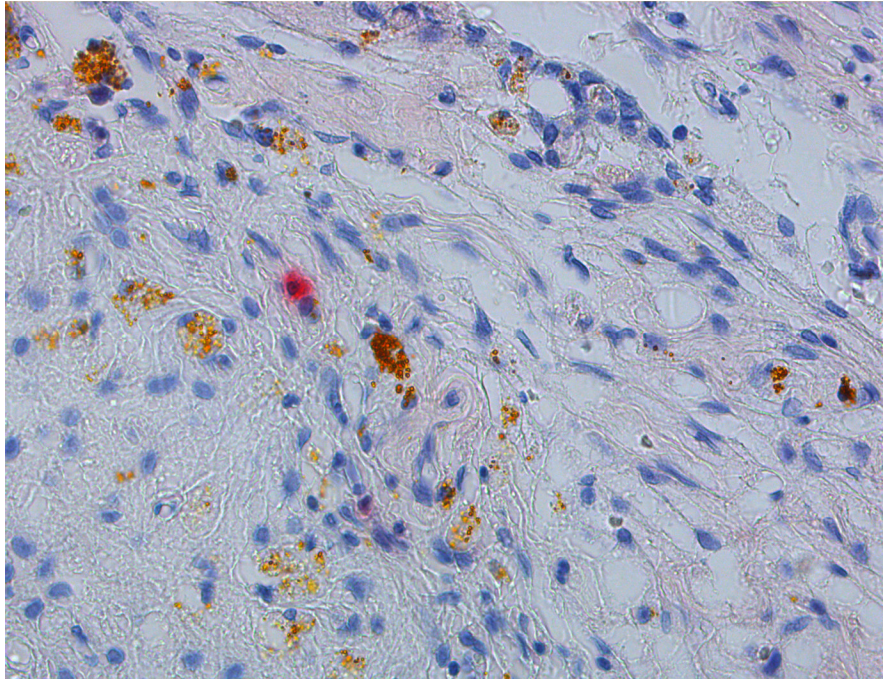


Abbildung 19: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich innerhalb des PLLA/BMP2-Scaffold nach 4 Wochen (40-fache Vergrößerung); Bohrspäne zwischen den Fasern

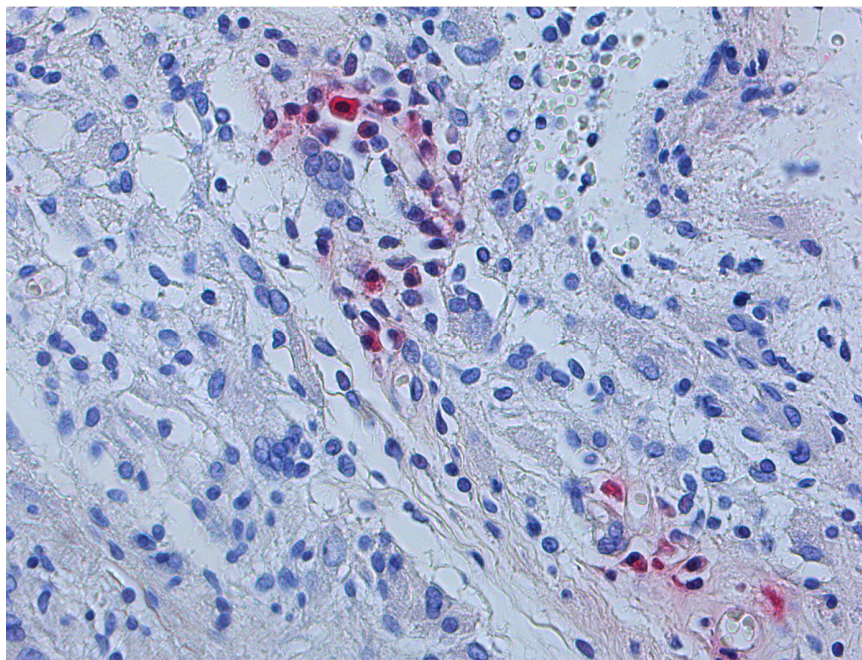


Abbildung 20: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich in der PLLA/BMP2-Gruppe nach 4 Wochen; (40-fache Vergrößerung)

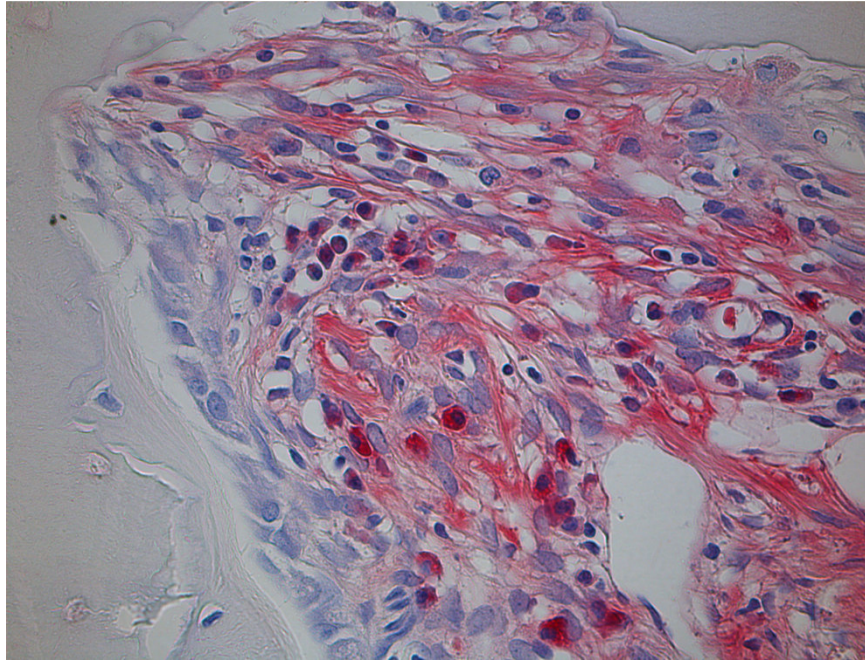


Abbildung 21: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich in der Spongiosa-Gruppe nach 8 Wochen; im linken Bildrand ist Rinderspongiosa sichtbar. Daran angrenzend bereits eine dünne Schicht neugebildeten Knochens (40-fache Vergrößerung)

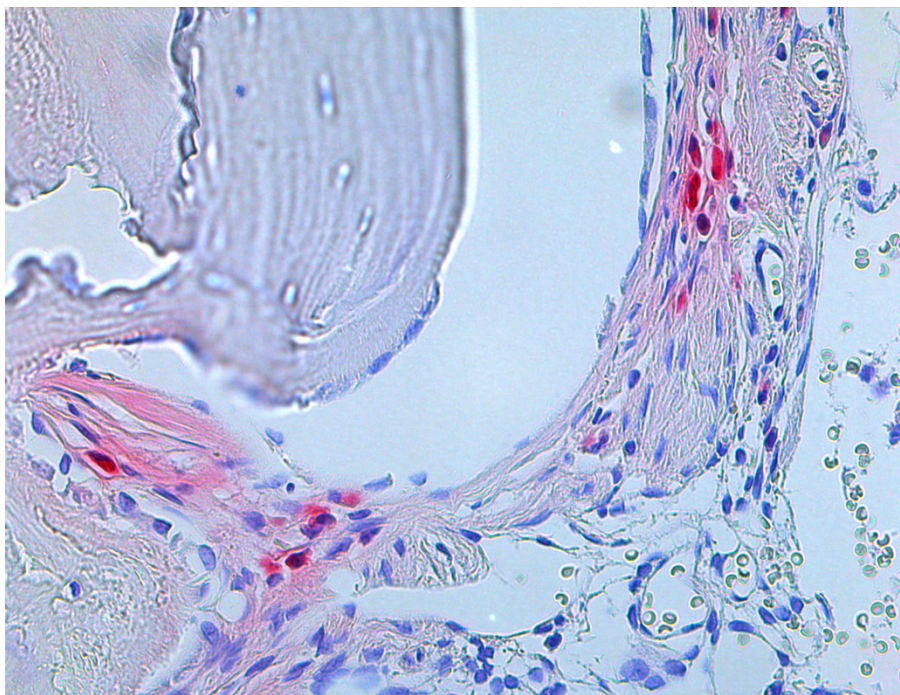


Abbildung 22: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich in der Spongiosa-Gruppe nach 12 Wochen. Im linken oberen Bildrand ist die Implantatspongiosa mit angelagerten HIF-1 α negativen Zellen sichtbar. Links unten zeigt sich neugebildeter Knochen (40-fache Vergrößerung)

3.1.4. Nachweis von HIF-1 α positiven Zellen in neugebildetem Knochen

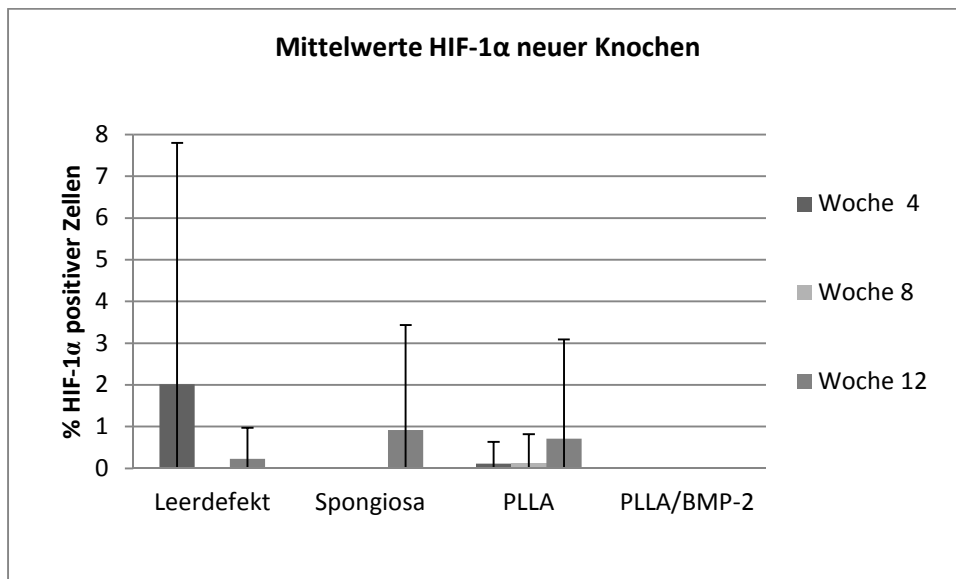


Abbildung 23: Anzahl der HIF-1 α positiven Zellen im Verhältnis zu den HIF-1 α negativen Zellen im Verlauf von 4 bis 12 Wochen in neuem Knochen, ausgezählt in 40-facher Vergrößerung

Abbildung 23 veranschaulicht, dass es allgemein bei den analysierten Tieren in neugebildetem Knochengewebe nur sehr wenig bis keine HIF-1 α positive Zellen und somit keine Hypoxie gibt.

Die Anzahl liegt, sofern überhaupt nachweisbar, zwischen 0,2 - 2 %. Aus diesem Grund wird der HIF-1 α Expression in diesem Zusammenhang ebenfalls keine Relevanz beigemessen.

In der negativen Kontrollgruppe (Leerdefekt) ist zum Zeitpunkt nach vier Wochen ein Nachweis von HIF-1 α positiven Zellen mit 2 ($2,0 \pm 5,8$) vorhanden, geht dann jedoch stark zurück auf 0,2 ($0,2 \pm 0,8$) nach zwölf Wochen. Nach acht Wochen konnte in dieser Gruppe immunhistochemisch keine positive Zelle im CSD gefunden werden (vgl. Abbildung 26). In der positiven Kontrollgruppe (Spongiosagruppe) ist das Aufzeigen einer sehr geringen HIF-1 α -Expression nur nach zwölf Wochen ($0,9 \pm 2,5$) möglich (s. Abbildung 24 und Abbildung 28). Die PLLA-Gruppe zeigt eine sehr geringe Expression in allen Zeitabschnitten, ansteigend zur zwölften Woche ($0,7 \pm 2,4$) (vgl. Abbildung 27). In

der PLLA/BMP-2 Gruppe konnte zu keinem Zeitpunkt eine Expression nachgewiesen werden (s. Abbildung 25). Statistisch gesehen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den vier Behandlungsgruppen nach der vierten Woche ($p = 0,05$).

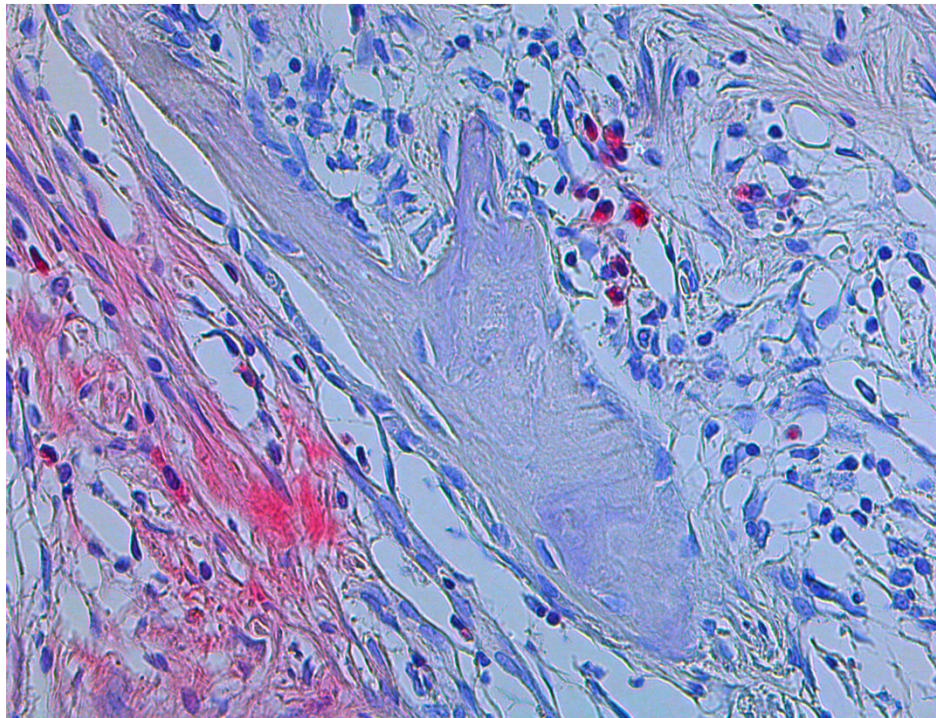


Abbildung 24: Nach 4 Wochen in der Spongiosa-Gruppe einzelne HIF-1 α positive Zellen um den neugebildeten Knochen herum (40-fache Vergrößerung)

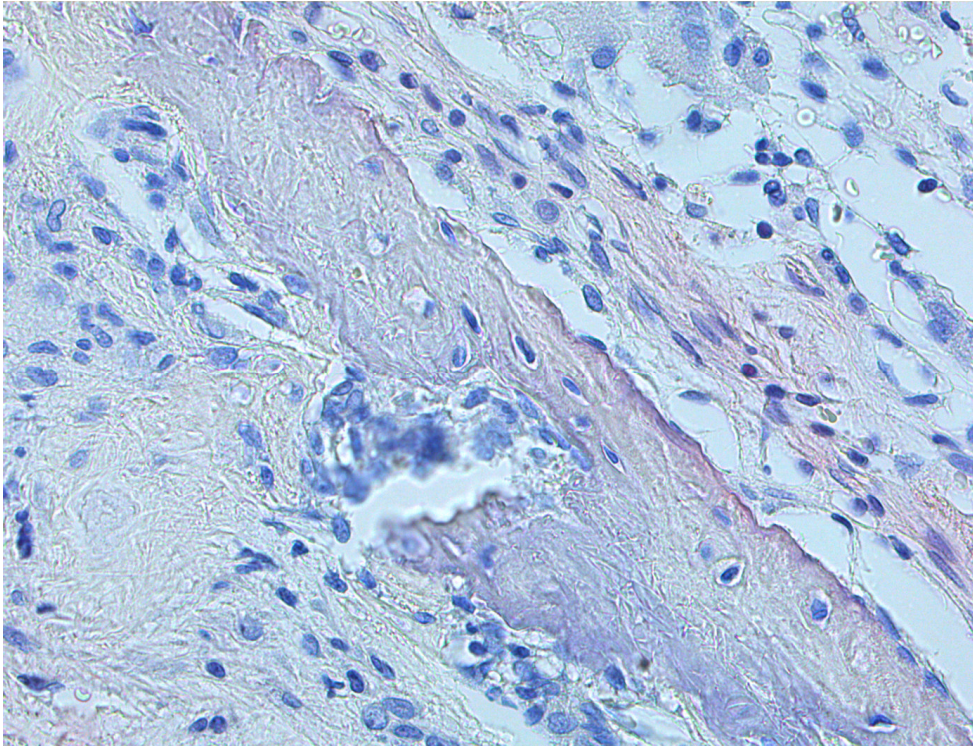


Abbildung 25: Mittig Knochenneubildung an das im linken Bildrand sichtbare PLLA/BMP2-Scaffold angrenzend, keine HIF-1 α positive Zellen nach 4 Wochen (40-fache Vergrößerung)

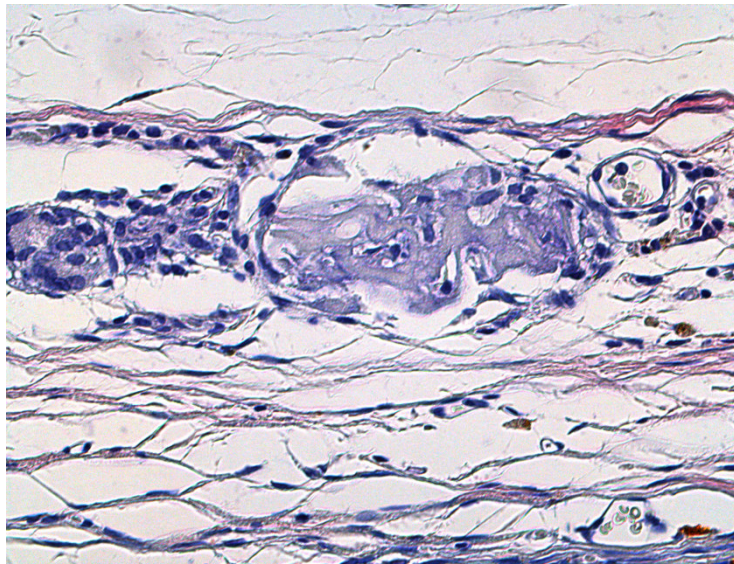


Abbildung 26: HIF-1 α positive Zellen in neuem Knochen in der Kontroll-Gruppe nach 8 Wochen; mittig ist eine geringe Osteoidbildung sichtbar, keine HIF-1 α positiven Zellen (40-fache Vergrößerung)

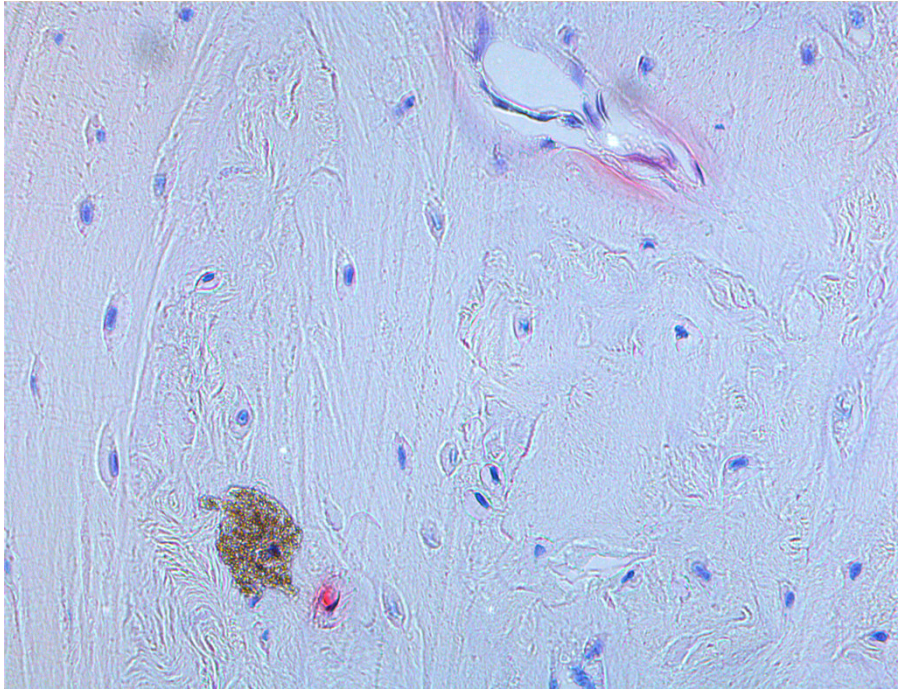


Abbildung 27: Eine HIF-1 α positive Zelle in neuem Knochen in der PLLA-Gruppe nach 12 Wochen (40-fache Vergrößerung)

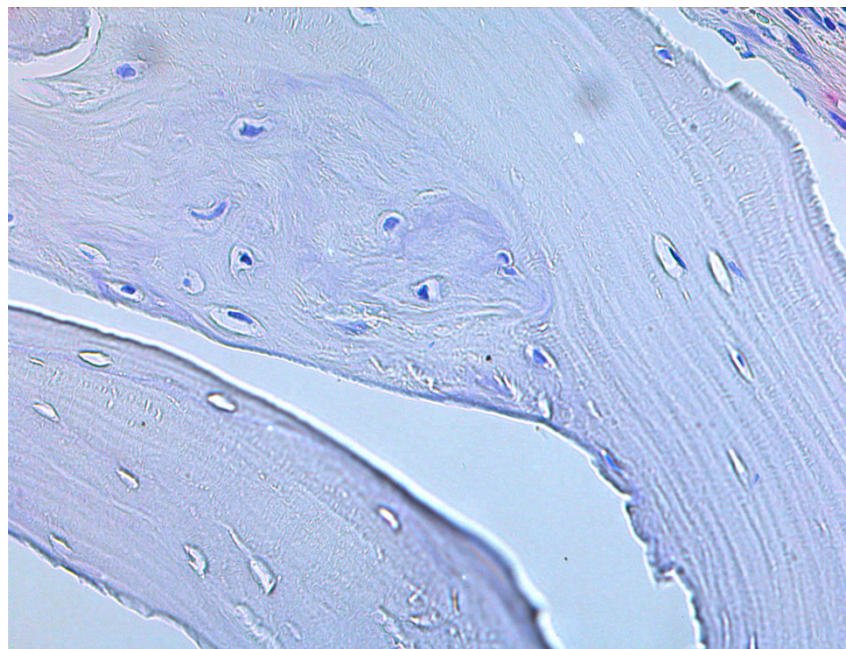


Abbildung 28: HIF-1 α -Färbung in neuem Knochen der Spongiosa-Gruppe nach 12 Wochen, jedoch ohne positive HIF-1 α Zellen. Deutlich erkennbar das Tutobone® am Fehlen der Zellkerne im Knochengewebe im linken unteren Teil des Bildes. (40-fache Vergrößerung)

3.2. Tabellarische Deskriptive Statistik

Mittelwerte VEGF positiver Zellen im Defektareal

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Woche 4	Leerdefekt	24	12,5995	9,97657	2,03646
	Spongiosa	27	4,0976	3,84713	0,74038
	PLLA	27	10,4468	5,86581	1,12888
	PLLA/BMP-2	27	15,001	10,0712	1,9382
	Gesamt	105	10,4773	8,75158	0,85407
Woche 8	Leerdefekt	27	12,3371	6,95975	1,3394
	Spongiosa	27	6,3684	6,33104	1,21841
	PLLA	27	10,5507	10,19136	1,96133
	PLLA/BMP-2	25	13,5471	10,07857	2,01571
	Gesamt	106	10,6471	8,84887	0,85948
Woche 12	Leerdefekt	27	10,0545	6,28969	1,21045
	Spongiosa	21	14,4484	9,20742	2,00922
	PLLA	27	12,8758	7,85797	1,51227
	PLLA/BMP-2	22	13,1554	6,71949	1,4326
	Gesamt	97	12,4944	7,59124	0,77077

Mittelwerte VEGF positiver Zellen in neugebildetem Knochen

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Woche 4	Leerdefekt	19	11,5626	16,00155	3,67101
	Spongiosa	25	2,7356	3,65931	0,73186
	PLLA	24	12,5771	13,70416	2,79735
	PLLA/BMP-2	27	14,2826	12,90867	2,48428
	Gesamt	95	10,2691	12,88064	1,32153
Woche 8	Leerdefekt	24	9,8354	13,35564	2,72621
	Spongiosa	26	7,2577	7,58831	1,48819
	PLLA	24	42,491	104,55857	21,34293
	PLLA/BMP-2	24	10,9571	7,09919	1,44912
	Gesamt	98	17,4235	53,56393	5,41077

Woche 12	Leerdefekt	26	7,0759	5,91318	1,15967
	Spongiosa	21	6,5102	7,25146	1,5824
	PLLA	24	7,063	6,46376	1,31941
	PLLA/BMP-2	21	8,2136	6,79386	1,48254
	Gesamt	92	7,2031	6,49793	0,67746

Mittelwerte HIF-1 α positiver Zellen im Defektareal

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Woche 4	Leerdefekt	21	0,1457	0,27087	0,05911
	Spongiosa	24	2,9886	2,21432	0,452
	PLLA	24	0,1061	0,30034	0,06131
	PLLA/BMP-2	24	2,6836	5,01429	1,02354
	Gesamt	93	1,5241	3,06897	0,31824
Woche 8	Leerdefekt	24	1,9664	2,83955	0,57962
	Spongiosa	24	4,4574	4,29279	0,87626
	PLLA	24	0,1051	0,40967	0,08362
	PLLA/BMP-2	24	3,9427	5,47676	1,11794
	Gesamt	96	2,6179	4,08862	0,41729
Woche 12	Leerdefekt	24	1,0417	1,0404	0,21237
	Spongiosa	21	4,3231	3,7165	0,81101
	PLLA	24	0,471	1,19221	0,24336
	PLLA/BMP-2	21	2,2196	2,65117	0,57853
	Gesamt	90	1,93	2,73648	0,28845

Mittelwerte HIF-1 α positiver Zellen in neugebildetem Knochen

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Woche 4	Leerdefekt	17	2,0168	5,78216	1,40238
	Spongiosa	24	0	0	0
	PLLA	21	0,1134	0,51957	0,11338
	PLLA/BMP-2	24	0	0	0
	Gesamt	86	0,4264	2,64379	0,28509
Woche 8	Leerdefekt	23	0	0	0

Woche 12	Spongiosa	23	0	0	0
	PLLA	24	0,1389	0,68041	0,13889
	PLLA/BMP-2	24	0	0	0
	Gesamt	94	0,0355	0,34381	0,03546
	Leerdefekt	22	0,2302	0,74511	0,15886
	Spongiosa	21	0,9153	2,51732	0,54932
	PLLA	23	0,7147	2,37168	0,49453
	PLLA/BMP-2	21	0	0	0
	Gesamt	87	0,4681	1,78361	0,19122

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Zusammenhangs der Angiogenese während der Knochendefektheilung bei Nanofaserscaffolds *in vivo* und die Rolle der Hypoxie hierbei durch die immunhistochemische Betrachtung der Expression des Signalmoleküls HIF-1 α und des Wachstumsfaktors VEGF.

Für das Überleben der Zellen in Implantaten ist ihre Versorgung mit Sauerstoff, Glucose und Aminosäuren sowie der Abtransport ihrer Stoffwechselmetabolite CO₂, Laktat oder Harnstoff lebensnotwendig. Die Versorgung mit Sauerstoff stellt den limitierenden Faktor für das Zellüberleben dar. Dieser Versorgungstransport wird einerseits durch das vaskuläre System direkt, andererseits durch passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten gewährleistet, wobei alle umliegenden Zellen um die Nährstoffe konkurrieren (Muschler et al. 2004). Für Sauerstoff gibt es ein Diffusionslimit von 200 μ m zwischen der Kapillarmembran und der Zellmembran (Novosel et al. 2011, Muschler et al. 2004). Wird dieses Limit überschritten, kommt es zu einer zentralen Nekrose (Muschler et al. 2004). Somit ist unabhängig des verwendeten Knochenersatzmaterials eine ausreichende Vaskularisierung für das Zellüberleben ausschlaggebend (Young et al. 2009). Ist diese nicht suffizient gegeben, resultiert eine verzögerte Knochenheilung. Daher kommt der Neovaskularisation bei der Knochendefektheilung eine Schlüsselrolle zu (Geris et al. 2008, Novosel et al. 2011). Viele Forschungsergebnisse weisen den HIF-1 α -Signalweg als zentralen Regulator für die Initiierung der Angiogenese und deren Verknüpfung mit der Knochenbildung aus (Riddle et al. 2009). Durch eine Überexpression von HIF-1 α kann die von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks ausgehende Osteogenese und Angiogenese deutlich verbessert werden (Zou et al. 2011). Die Zielgene von HIF-1 α beeinflussen direkt die Knochenzellen oder stimulieren die Angiogenese beispielsweise über VEGF oder andere angiogene Faktoren und unterstützen auf diesem Weg die Knochenbildung oder -heilung (Riddle et al. 2009). Somit spielen die Angiogenese und die Hypoxie eine wichtige Rolle bei der Knochendefektheilung.

Um herauszufinden in wie weit die Knochendefektheilung durch Nanofaser-Scaffolds beeinflusst wird, wurden in einer vorangegangenen Studie verschiedene Scaffolds

analysiert. Bei reinen PLLA-Scaffolds und Leerdefekten konnte keine Heilung erreicht werden. Die PLLA-Scaffolds zeigten eine gute Zellkolonisation, jedoch nur wenige Stellen, meist an den Randzonen zu altem Knochen gelegen, mit einer Knochenneubildung. In der Leerdefektgruppe trat nur die Bildung einer fibrinösen Membran auf. Bei mit BMP-2 beschichteten PLLA-Scaffolds wurde eine rasche, vollständige Ausheilung beobachtet. (Schofer et al. 2011a)

Um herauszufinden, ob die ausgebliebene Heilung in der Kontrollgruppe und in der PLLA-Gruppe aufgrund der Aussagen in der Literatur durch eine unzureichende Blutgefäßversorgung bedingt war und ob durch eine Steigerung der Angiogenese die Heilung verbessert werden könnte, untersuchten wir in dieser Arbeit die Kalottenpräparate auf die Expression des Signalmoleküls HIF-1 α und die des Wachstumsfaktors VEGF in den Defektbereichen und in neuem Knochen.

Die verwendeten Nanofaserscaffolds hatten eine Größe von 25 mm², was dem 25-fachen des Diffusionslimits entspricht. Aus diesem Grund gingen wir davon aus, mehrere hypoxische Bereiche in den Defektarealen zu finden, und somit eine mögliche Ursache für die ausgebliebene Heilung. Bei einer Absenkung des O₂-Gehaltes auf 2 %, einer Hypoxie entsprechend, kommt es zur Aktivierung von HIF-1 α . Dies führt zu einer nachweislichen HIF-1 α Konzentrationsabnahme im Cytoplasma von Osteoblasten und einem gleichzeitigen Anstieg im Kern, woraus ein Ansteigen der mRNA der Zielgene für VEGF und Glut-1 resultiert (Wang et al. 2007). Es zeigte sich bei uns jedoch keine Hochregulation des Signalmoleküls HIF-1 α oder des Wachstumsfaktors VEGF, was in der Folge eine Neubildung von Gefäßen in diesen Bereichen bewirkt hätte. Ebenso wurden keine Nekrosezonen gefunden. Somit kann man davon ausgehen, dass die Defektareale zu den Untersuchungszeitpunkten stets ausreichend sowohl mit Nährstoffen, als auch mit Sauerstoff versorgt gewesen sein müssen. Im Gegenteil war das Vorkommen von HIF1 α - oder VEGF-positiven Zellen unabhängig von den verwendeten Scaffolds, von einer eintretenden Knochenneubildung oder dem untersuchten Areal stets auf einem gleichen, basalen Level. Der Anteil von HIF-1 α -positiven Zellen lag stets zwischen 0-4 %, der an VEGF-positiven Zellen befand sich in allen vier Gruppen im Defektareal zwischen 10-15 %.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen der Dissertation von Marie Birke *Zur Rolle der Vaskularisation bei der Einheilung von Nanofaseraffolds in vivo*. Auch hier fanden sich keine Unterschiede in der Gefäßverteilung zwischen den vier Gruppen und stets eine suffiziente Gefäßversorgung (Birke 2012). Hierdurch kommt man bereits zu dem Schluss, dass die Angiogenese zu diesem Zeitpunkt bei der knöchernen Einheilung der Nanofaseraffolds *in vivo* keine Rolle spielt bzw. abgeschlossen ist.

Es zeigte sich bei der Untersuchung von HIF-1 α im Gegensatz zu VEGF eine statistisch signifikante Erhöhung nach vier Wochen im Defektbereich in den beiden Gruppen, in denen eine Knochenheilung eintrat (Rinderspongiosa und PLLA/BMP-2). Dieses Ergebnis stützt die These, dass eine Hochregulation von HIF-1 α zu einer Förderung der Knochenheilung beiträgt oder zumindest mit ihr in Beziehung steht (Wang et al. 2007). So zeigte sich bei Knockout Mäusen, bei denen das von Hippel-Lindau-Gen (VHL) ausgeschaltet war, eine Überexpression von HIF-1 α , was in der Folge zur Entwicklung eines sehr dichten und gut vaskularisierten Knochens durch endochondrale Knochenbildung führte (Wang et al. 2007). Hiermit übereinstimmend findet sich in den beiden Gruppen, in denen eine Knochenheilung eintrat, der Spongiosa- und der PLLA/BMP2-Gruppe (Schofer et al. 2011a), zum Zeitpunkt nach vier Wochen im Defektbereich eine signifikant ($p = 0,012$) höhere Expression als bei der Leerdefekt- und PLLA-Gruppe, bei denen keine adäquate Knochenrestitution erfolgte. Aufgrund der geringen prozentualen Höhe kann dieser statistischen Signifikanz jedoch keine klinische Relevanz zugesprochen werden. Dennoch könnte es darauf hinweisen, dass eine Hochregulation von HIF-1 α zu einer Förderung der Knochenheilung in diesen beiden Gruppen beigetragen hat oder mit ihr in Zusammenhang steht, wenn auch nicht ersichtlich über den VEGF-Weg (Kanczler and Oreffo 2008). Denn betrachtet man den Verlauf der gefunden HIF-1 α -Expression über vier bis zwölf Wochen, wird deutlich, dass er in keiner Weise mit der von VEGF korreliert und es insgesamt nur zu einer sehr geringen HIF-1 α -Expression kam (0-4 %). Neben VEGF sind von HIF-1 α bis zu 100 verschiedene Zielgene bekannt, die für die verschiedensten Zellprozesse verantwortlich sind (Riddle et al. 2009). So spielt HIF-1 α vor allem bei der endochondralen Ossifikation eine Rolle, jedoch nicht bei der intramembranösen Ossifikation, wie sie in der Kalotte stattfindet. Denn dort führte eine Überexpression

von HIF-1 α zu keinem Unterschied bezüglich der Knochenheilung gegenüber der Kontrollgruppe (Wang et al. 2007), was unsere Ergebnisse bestätigen. Dementsprechend ist es möglich, dass für die Einheilung von Nanofaserscaffolds in CSD nicht der Signalweg von HIF-1 α über VEGF ausschlaggebend ist, sondern eine andere Regulationsschiene für die Knochenheilung in unserem Versuch wichtig sein könnte und für die vorhandene VEGF-Expression sorgte.

In neugebildetem Knochengewebe fand sich so gut wie keine HIF-Expression, weshalb man vermuten kann, dass dort ebenfalls anhaltend eine ausreichende Sauerstoffversorgung bestand und keine Hypoxie aufkam, sofern die Hypoxie als Hauptstimulator für die HIF-1 α -Expression angenommen wird. Somit muss dem erfolgten Zellwachstum in die azellulären Scaffolds stets parallel eine ausreichende Blutgefäßversorgung gefolgt sein im Gegensatz zu bereits besiedelten Scaffolds, bei denen die ausreichende Vaskularisation eine Herausforderung darstellt und für das Zellüberleben ausschlaggebend ist (Novosel et al. 2011). Diese Vermutung konnte wie bereits erwähnt bestätigt werden, denn es fand sich immer eine ausreichende Vaskularisation und keine Unterschiede in der Gefäßverteilung zwischen den vier Gruppen (Birke 2012). Dennoch ist auf statistischer Ebene auffallend, dass es in der PLLA/BMP2-Gruppe zu keinem Zeitpunkt eine HIF-1 α -Expression gab, wohingegen bei der reinen PLLA-Gruppe durchaus eine geringe Expression stattfand. Aufgrund dieser Beobachtung kann man postulieren, dass durch den BMP-Zusatz bessere Bedingungen für die Osteoblasten gegeben waren als ohne BMP.

Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Nanofaserscaffolds

Die implantierten PLLA-Nanofaserscaffolds waren zum Zeitpunkt der Implantation azellulär. Erst im Verlauf der Defektheilung wuchsen von den Defekträndern ausgehend Zellen zeitgleich mit Blutgefäßen ein, wodurch die notwendige Versorgung kontinuierlich gewährleistet war. Unabhängig von einer stattgefundenen Knochenneubildung zeigten, auch die ausschließlich PLLA enthaltenden Scaffolds, eine dichte einheitliche Zellbesiedelung (Schofer et al. 2011a). So kann man schließen, dass in azellulären Scaffolds, anders als bei in Bioreaktoren bereits besiedelten Scaffolds

(Boos et al. 2010), eine ausbleibende Knochenheilung nicht an einer Minderversorgung mit Blutgefäßen liegt.

Die ausgebliebene Verknöcherung in der PLLA-Gruppe könnte etwa an den Abbauprodukten, der Milchsäure, von PLLA gelegen haben (Li et al. 2006). Diese Möglichkeit stützt sich unter anderem auf Ergebnisse aus früheren *in vitro* Studien, die zeigten, dass die Verwendung von PLLA zu einer Herunterregulierung von Genen der Osteoblastenzelllinie führte (Schofer et al. 2009b). Allerdings ist zu bedenken, dass der eigentliche PLLA-Gehalt der Scaffolds aufgrund ihrer hohen Porosität sehr gering ist. Darüber hinaus führt ihre große Oberfläche zu einem schnellen Abtransport der anfallenden Abbauprodukte (Li et al. 2006, Schofer et al. 2011a), so dass es kaum zu einer pH-Wert-Senkung, die der Geweberegeneration entgegen wirkt, führen kann.

Eine weitere Folge der Abbauprodukte von PLLA kann eine Entzündungs- oder Fremdkörperreaktion in der Umgebung sein, sofern keine ausreichende Gefäßversorgung zum Abtransport der Abbauprodukte vorhanden ist (Heinemann et al. 2011, Ignatius et al. 2001). Es zeigten sich jedoch zu keinem Zeitpunkt Immun- oder Entzündungsreaktionen in irgendeiner Form (Schofer et al. 2011a). Diese Beobachtung spricht wiederum für eine stets ausreichende vaskuläre Perfusion der Scaffolds.

Untersuchungszeitpunkte

Es stellt sich natürlich die Frage, ob es vielleicht zu einem früheren Zeitpunkt, vor der vierten Woche, in unserem Versuch eine Hochregulation von HIF-1 α und VEGF gegeben haben könnte, und ob man einen früheren Untersuchungszeitpunkt hätte wählen sollen, um dies nachzuvollziehen.

Zu dieser Überlegung kommt man, betrachtet man die VEGF-Expression während der Knochenheilung. Denn diese zeigt sich vor allem involviert in die Angiogenese während der 2. Phase der Knochenheilung, der endochondralen Knochenbildung, und der 3. Phase, der primären Knochenneubildung (vgl. S. 10: 1.2.2 Sekundäre Knochendefektheilung) (Gerstenfeld et al. 2003). Vom zeitlichen Gesichtspunkt spricht dies bereits für den 14. – 21. Tag nach der Defektsetzung sofern man von einer

physiologischen Defektheilung ausgeht (Gerstenfeld et al. 2003, Dimitriou et al. 2005). Und dies liegt deutlich vor unserem ersten Untersuchungszeitpunkt - vier Wochen nach Defektsetzung.

Hätte es zu diesem früheren Zeitpunkt jedoch eine signifikante VEGF-Erhöhung gegeben, wären mehr Blutgefäße auch nach vier Wochen noch zu erwarten gewesen.

Die Knochenheilung verlief bei der PLLA/BMP-2-Gruppe zu Beginn am schnellsten, nach der zwölften Woche war jedoch kein signifikanter Unterschied zur Spongiosa-Gruppe mehr vorhanden (Schofer et al. 2011a). Wenn dies aufgrund einer verstärkten Angiogenese stattfand, müsste es vor der vierten Woche vor allem in diesen beiden Gruppen, da dort eine Knochenneubildung eintrat, was wiederum zur Defektheilung führte, eine VEGF- oder HIF-1 α -Hochregulation gegeben haben. Betrachtet man hierauf abzielend die Ergebnisse dieser Arbeit, so lässt sich in der PLLA/BMP-2-Gruppe als einzige die insgesamt höchste, jedoch nicht signifikante VEGF-Expression aller Gruppen bereits nach vier Wochen erkennen. Sie ist auch die einzige Gruppe, bei der es dann im weiteren Verlauf zu einer geringen Abnahme kommt, wobei diese wiederum nicht signifikant ist. Im Gegensatz hierzu weist die Spongiosa-Gruppe eine entgegengesetzte Expression auf. Sie gleicht sich bis zur 12. Woche jedoch an die PLLA/BMP-2-Gruppe an. So kann die zu Beginn höhere VEGF-Produktion mit dem eingewobenen BMP-2 in Verbindung gebracht werden (Deckers et al. 2002). Das durchaus für eine ausreichende, basale VEGF-Expression sorgte, die die Knochenheilung ermöglichte.

Zusätzliches Einbringen von VEGF in die Nanofaseraffolds

Wenn die durch HIF-1 α und VEGF vermittelte Angiogenese jedoch nicht die hauptsächliche Triebkraft für die Defektheilung darstellt, ist die Frage: Könnte das zusätzliche Einbringen von VEGF in die Nanofasermatten überhaupt einen positiven Nutzen bringen? Hierzu findet man in der Literatur verschiedene Standpunkte.

Die gestellte Hypothese wird kontrovers diskutiert. Sie wird durch diejenigen gestützt, die zu zeigen vermochten, dass der Einsatz von Wachstumsfaktoren im Tissue

Engineering nicht immer von Vorteil für die Heilung ist. So präsentierte sich nach 6 Wochen bei einer Meniskusläsion, die mit VEGF-beschichtetem PDLLA-Nahtmaterial verschlossen wurde, lediglich eine Bildung von Endothelzellen im Meniskusgewebe ohne eine Geweberegeneration, wie sie ohne VEGF-Beschichtung auftrat. Es kam durch den VEGF-Zusatz in das Polymer zu einer Behinderung der erwünschten Heilung, im Folgenden sogar zu einer Instabilität des Gewebes. Dies lässt vermuten, dass VEGF allein die Proliferation von Endothelzellen, aber nicht den komplexen Prozess der Vaskulogenese und Gewebeheilung in diesem Fall zu stimulieren vermochte (Petersen et al. 2007).

Nun ist Meniskus anders als Knochen ein avaskuläres Gewebe, bei dem wie in der Haut, der Cornea oder dem Knorpel das Diffusionslimit für Sauerstoff für die Zellversorgung größer ist, als die erwähnten 200 µm in vaskulärem Gewebe (Novosel et al. 2011). Dennoch verhinderten die auftretenden Blutgefäße, die nicht für die Heilung notwendig waren, die vollständige Meniskusregeneration. Im Gegenteil resultierte aus dem Auftreten vieler Blutgefäße eine erhöhte Instabilität des Gewebes. Ähnlich könnte ein zusätzliches, vermehrtes Auftreten von Blutgefäßen in unserem Versuch, da sie nach unseren Ergebnissen nicht benötigt werden, eine Heilung, dort wo sie eintrat, nämlich in der Spongiosa- oder PLLA/BMP2-Gruppe, sogar verhindern.

In einem Versuch mit VEGF produzierenden Myoblasten, die in die Beinmuskulatur von Mäusen injiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von VEGF von seiner Konzentration abhängt. So bewirkt ein niedriger VEGF-Spiegel (~ 40 pg/ml) die gewünschte Angiogenese in ischämischer Muskulatur, ohne gesunde benachbarte Muskeln zu beeinflussen. Wohingegen ein hoher Serumspiegel von 200 pg/ml VEGF in gesundem, nicht ischämem Muskel eine Vaskulogenese hervorrief, die zur Bildung eines Hämangioms führte (Springer et al. 1998). Durch weitere Studien am Myokard wurde ebenfalls die Wichtigkeit einer kontrollierten VEGF-Expression und die Folgen einer zu hohen exogenen Zufuhr gezeigt (Lee et al. 2000, Miquerol et al. 2000).

So könnte eine Beschichtung der Nanofaseraffolds mit VEGF, um den Regenerationsvorgang zu fördern, in einer zu hohen Konzentration möglicherweise

sogar eine kontraproduktive Wirkung haben, da zu keinem untersuchten Zeitpunkt Hypoxie herrschte.

In Bezug auf die Knochenbildung hängt der Synergismus von VEGF und BMP von ihrem Verhältnis zueinander ab (Peng et al. 2002). So führt ein zu hoher VEGF-Anteil im Verhältnis zur BMP-Dosis zu einer verminderten Knochenbildung (Peng et al. 2005). Aus diesem Grund muss bei einer exogenen VEGF-Zufuhr neben der Konzentration auch auf das Verhältnis zur BMP-Konzentration geachtet werden.

Dass der VEGF-Zusatz zu BMP-beschichteten Polymerscaffolds gegenüber Scaffolds, die nur mit BMP beschichtet sind, bei der Heilung von CSD bei Ratten in Bezug auf die Knochenregeneration keinen Vorteil zeigen, wurde ebenfalls von anderen Forschungsgruppen bestätigt und stützt somit wiederum unsere Hypothese (Young et al. 2009).

Dies lässt den Schluss ziehen, dass die Vaskularisierung nicht den limitierenden Faktor der Knochendefektheilung bei Nanofaserscaffolds im Rattenmodell darstellt. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die eigene angiogeneseanstoßende Fähigkeit von BMP-2 sein, das sowohl in Endothelzellen, als auch in Osteoblasten die VEGF-Expression zu stimulieren vermag (Deckers et al. 2002). Dies lässt sich auch in unseren Ergebnissen wider erkennen. Denn der BMP-Zusatz in den PLLA-Fasern führte nach vier Wochen zu dem höchsten VEGF-Vorkommen unter den vier Gruppen, wenn es auch nicht signifikant war. Durch diese Fähigkeit von BMP wird der Zusatz von VEGF überflüssig (Young et al. 2009). Es ist jedoch sehr deutlich, dass die endogene VEGF-Produktion für die Knochenbildung sehr wichtig ist, was durch die Verwendung eines VEGF-Antagonisten erwiesen werden konnte. VEGF als alleiniger Zusatz ohne BMP führt jedoch nicht zur gewünschten Knochenheilung (Peng et al. 2005).

Dies stützt unser Ergebnis insofern, als eine verstärkte Vaskularisierung nicht zu einer besseren Defektheilung führen würde, als diejenige, die bei den mit BMP-beschichteten PLLA-Nanofaserscaffolds in der vierten Gruppe bereits erreicht wurde. Auch zusätzliches VEGF wäre bei diesen Scaffolds überflüssig, da das Vorhandene für eine erfolgreiche Verknöcherung völlig ausreichend war. Einzig hätte es in der Anfangszeit schneller gehen können. Somit ist BMP als Zusatz ausreichend. Also

scheint die Angiogenese bei der knöchernen Einheilung azellulärer Nanofasermatten in CSD bei Ratten keine entscheidende Rolle zu spielen.

Positiver Nutzen durch einen VEGF-Zusatz

Entgegen unserer Hypothese wird in vielen Arbeiten der VEGF vermittelten Angiogenese jedoch eine zentrale Rolle in der Knochendefektheilung zugesprochen. Die Prozesse der Angiogenese und Knochenbildung sind demnach sowohl zeitlich als auch räumlich während der Knochenbildung oder -heilung eng miteinander verbunden (Wan et al. 2010, Jandial, Chen and Ciacci 2011). Dabei zeigt sich die synergetische Wirkung von BMP und VEGF auf Knochenneubildung und -heilung (Huang et al. 2005, Peng et al. 2002). Es kann durch die Inhibierung von VEGF durchaus eine Knochenheilung verhindert werden (Street et al. 2002).

Besitzen Zellen die zusätzliche Fähigkeit VEGF zu bilden, konnte *in vivo* durch eine deutliche Angiogenesesteigerung und mehr einsprossende Kapillaren vier, sieben und sehr deutlich zehn Tage nach Transplantat-Implantation ein Zusammenhang zwischen angiogener und osteogener Faktoren während der Knochenbildung und -heilung nachgewiesen werden (Peng et al. 2002). Allerdings lässt die so gesteigerte Angiogenese nach 14 Tagen wieder nach (Peng et al. 2002).

Weiterhin konnte durch die gleichzeitige, kombinierte Freisetzung der beiden Faktoren BMP-2 und VEGF, während der Knochenheilung, die früheste und beste Knochenheilung *in vivo* induziert werden. Sowohl in ihrer Quantität, dem Knochenvolumen, als auch in ihrer Qualität, der Knochendichte, war man durch die Kombination des angiogenen und des osteogenen Faktors der des ursprünglichen Knochens am nächsten. Vor allem im Zeitraum nach vier Wochen vermochte VEGF die Knochenvolumenbildung signifikant zu beschleunigen. Hieraus kann man den Schluss ziehen, dass eine beschleunigte Knochenregeneration von der Blutversorgung abhängt (Xiao et al. 2011). Jedoch ist dieser signifikante Vorteil durch den VEGF-Zusatz nur nach der vierten Woche nach Defektsetzung nachweisbar, jedoch nicht mehr nach der zwölften Woche (Patel et al. 2008, Young et al. 2009, Xiao et al. 2011).

Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe im Hinblick auf die Knochenheilung überein. Ebenfalls fanden wir unser Ergebnis der geringen VEGF-Expression in der reinen BMP-Gruppe gleich wie in der Kontrollgruppe in der Literatur bestätigt (Xiao et al. 2011). So kann man folgern, dass ein VEGF-Zusatz nur in frühen Phasen der Knochenneubildung für die Defektheilung einen signifikanten Vorteil bringen könnte. Im Gegensatz dazu macht ein VEGF-Zusatz bei der Verwendung von zellbesiedelten Scaffolds durchaus Sinn, um eine ausreichende Angiogenese für das Überleben der vorhandenen Zellen bereitzustellen (Huang et al. 2005). Ebenfalls ist eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch Blutgefäße bei in Bioreaktoren bereits vor Implantation besiedelten Scaffolds von großer Wichtigkeit, da die sonst im Zentrum des Implantates angewachsenen Zellen absterben (Boos et al. 2010). Dies widerspricht unserem Statement jedoch nicht, da die von uns verwendeten Scaffolds zum Zeitpunkt der Implantation azellulär sind und somit das zusätzliche Einbringen von VEGF keinen Vorteil bringen sollte.

Limitation der Studie

Zunächst ist die Studie ein reines Tiermodell, das so nicht auf den Menschen übertragbar ist. Weiter wurde lediglich die Knochendefektheilung in der Schädelcalotte untersucht, jedoch nicht die Defektheilung in anderen Knochen. Darüber hinaus kann man die Gesamtzahl von 120 Tieren als einen zu geringen Stichprobenumfang kritisieren. Ebenso ist, wie weiter oben bereits diskutiert, eventuell der Zeitpunkt für die Untersuchung auf die HIF-1 α und VEGF Expression zu spät gewählt. Eine weitere Einschränkung besteht in der Verwendung eines rein visuellen Auswerteverfahrens, das zu dem nur von einer Person durchgeführt wurde.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Zusammenhang der Angiogenese bei der Einheilung von PLLA-Nanofaseraffolds in Knochendefekte *in vivo* durch die immunhistochemische Betrachtung der Expression des Signalmoleküls HIF-1 α und des Wachstumsfaktors VEGF.

Um dies zu untersuchen wurden in Calottendefekten eines Rattenmodells HIF-1 α - und VEGF-positive Zellen immunhistochemisch nachgewiesen.

Die Analyse von HIF-1 α zeigte, dass sehr wenige bis keine positiven Zellen vorliegen. Es konnte somit zu keinem Zeitpunkt eine Hypoxie aufgezeigt werden. Dieses Ergebnis wird durch die VEGF-Analyse unterstützt. Hierbei konnte nur eine Expression auf basalem Level dargestellt werden.

Zwischen der eintretenden Knochendefektheilung und einer damit einhergehenden Hochregulation von HIF-1 α oder VEGF konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang aufgezeigt werden. Es zeigte sich sowohl bei HIF-1 α , als auch bei VEGF, unabhängig von einer stattfindenden Knochenheilung, dem verwendeten Material oder dem Untersuchungszeitpunkt stets nur eine Basalexpression, die in der PLLA/BMP-2-Gruppe für eine erfolgreiche Verknöcherung absolut ausreichend war. Aufgrund dieses Ergebnisses gehen wir davon aus, dass die einwandernden Zellen auf den Scaffolds stets ausreichend mit Sauerstoff versorgt waren und zu keinem Zeitpunkt eine Hypoxie auftrat. Ohne Hypoxie kommt es nicht zu einer vermehrten Expression von VEGF und einer verstärkten Angiogenese, weshalb bei der ausbleibenden Einheilung der Nanofasermatten die Angiogenese keine entscheidende Rolle zu spielen scheint oder ein Mangel an VEGF nicht der Grund für die ausbleibende Knochenheilung ist. Daher würde in diesem Fall ein Zusatz von VEGF in die Scaffolds keinen Vorteil für die knöcherne Einheilung darstellen.

5.1. Summary

This dissertation examines the correlation of the angiogenesis during the incorporation of PLLA-nanofibre scaffolds in the healing process of bone defects of living rats and the expression of the signalling molecule HIF-1 α as well as the growth factor VEGF with immunohistochemical methods.

In the research we verified HIF-1 α and VEGF-positive cells in calvarial defects of rats with immunohistochemical methods.

The analysis of HIF-1 α showed us that none or only a few positive cells could be proven. Hypoxia was never indicated at any time. The VEGF-analysis supported this result. This analysis showed only an expression on basic.

We could not verify a correlation between the healing of the bone defect and an alteration of HIF-1 α or VEGF. The results always showed a basal expression both in HIF-1 α and VEGF regardless of the bone healing, the used material or the time of the examination. The proven basal expression was absolutely sufficient for the successful ossification in the PLLA/BMP-2-group. On the basis of these results we assume that there was always provided enough oxygen for the cells migrating to the scaffolds. We could not observe hypoxia at any time. Without hypoxia there will neither be an increasing expression of VEGF nor an amplified angiogenesis. Therefore the angiogenesis does not affect the deficient incorporation of the nanofibre scaffolds in the ossification process and the lack of VEGF is not the reason for failure of bone healing.

As a conclusion of our results follows to sum up that in such a case the adding of VEGF into the scaffolds would not constitute a benefit for the ossification process.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der sekundären Knochendefektheilung: (1) <i>Entzündungsphase</i> mit Hämatombildung, (2) <i>Granulationsphase</i> mit der Bildung des weichen Kallus über desmale Ossifikation der externe Kallus und über chondrale Ossifikation der interne Kallus, (3) <i>Bildung des harten Kallus</i> durch Mineralisation und Bildung von Geflechtknochen, (4) <i>Knochenumgestaltung (Remodeling)</i> mit funktioneller Adaptation zu lamellärem Knochen unter Abbau von überschüssigem Kallus. Modifiziert nach Carano und Filvaroff (Carano and Filvaroff 2003).	10
Abbildung 2: Elektrogenesponnene Matrix aus 3,5 % Polylaktid in Dichlormethan (Boudriot et al. 2004)	26
Abbildung 3: Operation und Heilungsverlauf der Sprague-Dawley Ratten a: Setzen der CSD, b: durch Naht verschlossener OP-Bereich, c: vollständig verheilte Wunde, d: OP-Präparat der Calotte vor der Einbettung in Paraffin (Schofer et al. 2011a).....	28
Abbildung 4: Positivkontrolle, VEGF-positive Mastzellen im Knochenmark (40-fache Vergrößerung)	37
Abbildung 5: HIF-1 α positive Zellen im Knochenmarkraum.....	38
Abbildung 6: Mittelwerte VEGF Defekt: Anzahl der VEGF-positiven Zellen im Verhältnis zu den VEGF-negativen Zellen im Verlauf von 4 bis 12 Wochen, ausgezählt in 40-facher Vergrößerung.....	39
Abbildung 7: VEGF-positive Zellen im CSD-Bereich in der Kontroll-Gruppe nach 4 Wochen (40-fache Vergrößerung).....	40
Abbildung 8: VEGF-positive Zellen im CSD-Bereich in der PLLA-Gruppe nach 4 Wochen: Die Faserstruktur ist deutlich auf dem ganzen Ausschnitt erkennbar (40-fache Vergrößerung)	41
Abbildung 9: VEGF-positive Zellen im CSD-Bereich in der Spongiosa-Gruppe nach 8 Wochen: Die positiven Zellen finden sich in diesem Präparat in der Nähe kleiner Blutgefäße am Rande zur Rinderspongiosa hin (40-fache Vergrößerung)	41
Abbildung 10: VEGF-positive Zellen im CSD-Bereich in der PLLA/BMP2-Gruppe nach 12 Wochen im linken Bildrand ist neugebildeter Knochen sichtbar, der jedoch keine positiven Zellen mehr aufweist (40-fache Vergrößerung)	42

Abbildung 11: Mittelwert VEGF in neugebildetem Knochen: Anzahl der VEGF-positiven Zellen im Verhältnis zu den VEGF-negativen Zellen im Verlauf von 4 bis 12 Wochen, ausgezählt in 40-facher Vergrößerung.....	42
Abbildung 12: VEGF-positive Zellen in neugebildetem Knochen in der PLLA-Gruppe nach 4 Wochen; erkenntlich sind in dem neugebildeten Knochengewebe, die Struktur der Nanofasern und rechts oben Defektgewebe (40-fache Vergrößerung).....	44
Abbildung 13: VEGF-positive Zellen um kleine Knochenneubildungen herum in der Leerdefekt-Gruppe nach 8 Wochen (40-fache Vergrößerung)	44
Abbildung 14: VEGF-positive Zellen in neugebildetem Knochen in der PLLA/BMP2-Gruppe nach 8 Wochen, mittig und im unteren Ausschnitttrand sind Erythrozyten sichtbar (40-fache Vergrößerung)	45
Abbildung 15: VEGF-positive Zellen in neugebildetem Knochen in der PLLA/BMP2-Gruppe nach 12 Wochen; im linken Bildteil nehmen die Knochenzellen keinerlei Farbe auf, rechts oben ist im neuen Knochen noch die Faserstruktur sichtbar, im rechten unteren Areal und links oben eine deutliche Positivfärbung, jedoch noch nicht vollständig regenerierter Knochen (40-fache Vergrößerung).....	45
Abbildung 16: VEGF-positive Zellen in neugebildetem Knochen in der PLLA-Gruppe nach 12 Wochen; Im fertigen Knochen selbst sind nur einzelne positive Zellen erkennbar, im anschließenden Defektgewebe deutlich mehr positive Zellen (40-fache Vergrößerung)	46
Abbildung 17: Mittelwert der HIF-1 α -positiven Zellen im Verhältnis zu den HIF-1 α -negativen Zellen im CSD-Bereich im Verlauf von 4 bis 12 Wochen, ausgezählt in 40-facher Vergrößerung	46
Abbildung 18: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich in der Spongiosa-Gruppe nach 4 Wochen (40-fache Vergrößerung).....	48
Abbildung 19: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich innerhalb des PLLA/BMP2-Scaffold nach 4 Wochen (40-fache Vergrößerung); Bohrspäne zwischen den Fasern	49
Abbildung 20: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich in der PLLA/BMP2-Gruppe nach 4 Wochen; Präparat (40-fache Vergrößerung).....	49

Abbildung 21: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich in der Spongiosa-Gruppe nach 8 Wochen; im linken Bildrand ist Rinderspongiosa sichtbar. Daran angrenzend bereits eine dünne Schicht neugebildeten Knochens (40-fache Vergrößerung)	50
Abbildung 22: HIF-1 α positive Zellen im CSD-Bereich in der Spongiosa-Gruppe nach 12 Wochen. Im linken oberen Bildrand ist die Implantatspongiosa mit angelagerten HIF-1 α negativen Zellen sichtbar. Links unten zeigt sich neugebildeter Knochen (40-fache Vergrößerung)	50
Abbildung 23: Anzahl der HIF-1 α positiven Zellen im Verhältnis zu den HIF-1 α negativen Zellen im Verlauf von 4 bis 12 Wochen in neuem Knochen, ausgezählt in 40-facher Vergrößerung	51
Abbildung 24: Nach 4 Wochen in der Spongiosa-Gruppe einzelne HIF-1 α positive Zellen um den neugebildeten Knochen herum (40-fache Vergrößerung)	52
Abbildung 25: Mittig Knochenneubildung an das im linken Bildrand sichtbare PLLA/BMP2-Scaffold angrenzend, keine HIF-1 α positive Zellen nach 4 Wochen (40-fache Vergrößerung)	53
Abbildung 26: HIF-1 α positive Zellen in neuem Knochen in der Kontroll-Gruppe nach 8 Wochen; mittig ist eine geringe Osteoidbildung sichtbar, keine HIF-1 α positiven Zellen (40-fache Vergrößerung)	53
Abbildung 27: Eine HIF-1 α positive Zelle in neuem Knochen in der PLLA-Gruppe nach 12 Wochen (40-fache Vergrößerung).....	54
Abbildung 28: HIF-1 α -Färbung in neuem Knochen der Spongiosa-Gruppe nach 12 Wochen, jedoch ohne positive HIF-1 α Zellen. Deutlich erkennbar das Tutobone® am Fehlen der Zellkerne im Knochengewebe im linken unteren Teil des Bildes. (40-fache Vergrößerung)	54

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rehydrierung der Präparate in der mit Xylol beginnenden absteigenden Alkoholreihe.....	29
Tabelle 2: Färbeprotokoll für VEGF Tag 1.....	31
Tabelle 3: Färbeprotokoll für VEGF Tag 2.....	32
Tabelle 4: Färbeprotokoll für HIF-1 α Tag 1.....	33
Tabelle 5: Färbeprotokoll für HIF-1 α Tag 2.....	34
Tabelle 6: Aufsteigende Alkohol-Xylol-Reihe zur Dehydrierung der VEGF- und HIF-Präparate.....	35

9. Abkürzungsverzeichnis

ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (HIF- 1 β)	HIF-1 α	hypoxia-inducible factor-1 α
		HO-1	induzierbare Hämoxygenase-1
BMA	bone marrow aspirate	HRE	hypoxia-responsive- element
BMP	bone morphogenetic protein	IGF	insulin-like growth factor
BCP	biphasic calcium phosphate	IL	Interleukin
ca.	circa	iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	KDR	kinase insert domain containing receptor
CSD	critical size defect	kV	Kilovolt
DBM	demineralized bone matrix	kVm ⁻¹	elektrische Feldstärke: Kilovolt pro Meter
ECM	extrazelluläre Matrix	MEF-2C	myocyte enhancer binding factor-2C
EPO	Erythropoetin	MMP	Matrix-Metalloproteasen
et al.	und andere	MSC	Mesenchymale Stammzelle
EtOH	Ethanol	MDGF	macrophage - derived growth factor
FCS	fetales Kalbserum	min	Minute
FDA	U.S. Food and Drug Administration	ml	Milliliter
FGF	fibroblast growth factor	μ l	Mikroliter
Flt-1	fms-like tyrosine kinase	mm	Millimeter
std	Stunde		
HA	Hydroxyapatit (Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂)		

mm ²	Quadratmillimeter	PU	Polyurethan
mM	Millimolar	s.	siehe
hMSC	humane mesenchymale Stammzelle	SD	Standardabweichung
ng	Nanogramm	SEM	scanning electron microscopy
NO	Stickstoffmonoxid	sog.	sogenannte
PBS	phosphate buffered saline	Syn.	Synonym
PCL	Poly-ε-Caprolactone	TCP	Tricalciumphosphat
PDGF	platelete derived growth factor	(Ca ₃ (PO ₄) ₂)	
PDS	Poly-Dioxanone, auch PDO	TNF-α	tumour necrosis factor-alpha
PE	Polyethylene	TGF-β	transforming growth factor-beta
PEG	Polyethylenglycol	VEGF	Vascular endothelial growth Factor
PET	Polyethylenterephthalat		
PGA	Polyglycolid	vgl.	vergleiche
PGK	Phosphoglycerat Kinase	VVO	vesikulo-vakuoläre Organellen
pH	potentia hydrogenii		
PLLA	Poly-L-Lactid	z.B.	zum Beispiel
PMMA	Polymethylmethacrylat	°	Grad
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck	°C	Grad Celsius
PP	Polypropylen	%	Prozent
PTFE	Polytetrafluoroethylene (Teflon)		

10. Literaturverzeichnis

- Ai-Aql, Z., A. Alagl, D. Graves, L. Gerstenfeld & T. Einhorn (2008) Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *Journal of Dental Research*, 87, 107-118.
- Albina, J. E., B. Mastrofrancesco, J. A. Vessella, C. A. Louis, W. L. Henry & J. S. Reichner (2001) HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 α induction in primary inflammatory cells by TNF- α . *Am J Physiol Cell Physiol*, 281, C1971-7.
- Aubin, J. (1998) Bone stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 73-82.
- Axelrad, T. W., S. Kakar & T. A. Einhorn (2007) New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury*, 38 Suppl 1, S49-62.
- Barnes, P. (2006) Transcription factors in airway diseases. *Laboratory Investigation*, 86, 867-872.
- Beebe, K. S., J. Benevenia, B. E. Tuy, C. A. DePaula, R. D. Harten & W. F. Enneking (2009) Effects of a new allograft processing procedure on graft healing in a canine model: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res*, 467, 273-80.
- Birke, M.-C. 2012. Zur Rolle der Vaskularisation bei der Einheilung von Nanofaserscaffolds in vivo. In *Fachbereich Medizin*. Marburg: Philipps-Universität Marburg.
- Bohndorf, Imhof & Fischer. 2006. *Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Boland, E., T. Telemeco, D. Simpson, G. Wnek, G. Bowlin (2004) Utilizing Acid Pretreatment and Electrospinning to Improve Biocompatibility of Poly(Glycolic Acid) for Tissue Engineering. *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 71B, 144–152.
- Boos, A., A. Arkudas, U. Kneser, R. Horch & J. Beier (2010) Bone Tissue Engineering for Bone Defect Therapy. *Handchirurgie Mikrochirurgie Plastische Chirurgie*, 42, 360-368.
- Bostrom, M., J. Lane, W. Berberian, A. Missri, E. Tomin, A. Weiland, S. Doty, D. Glaser & V. Rosen (1995) Immunolocalization and expression of bone morphogenetic protein-2 and protein-4 in fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 13, 357-367.
- Boudriot, U., R. Dersch, B. Goetz, P. Griss, A. Greiner & J. H. Wendorff (2004) Electrospun poly-l-lactide nanofibres as scaffolds for tissue engineering. *Biomedizinische Technik*, 49, 242-247.
- Boudriot, U., R. Dersch, A. Greiner & J. H. Wendorff (2006) Electrospinning approaches toward scaffold engineering--a brief overview. *Artif Organs*, 30, 785-92.

- Buck, D. W. & G. A. Dumanian (2012) Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg*, 129, 1314-20.
- Carano, R. A. & E. H. Filvaroff (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*, 8, 980-9.
- Carmeliet, P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6, 389-395.
- Carson, J. S. & M. P. G. Bostrom (2007) Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury*, 38, S33-S37.
- Cheng, H., W. Jiang, F. Phillips, R. Haydon, Y. Peng, L. Zhou, H. Luu, N. An, B. Breyer, P. Vanichakarn, J. Szatkowski, J. Park & T. He (2003) Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 85A, 1544-1552.
- Christenson, E. M., K. S. Anseth, J. J. van den Beucken, C. K. Chan, B. Ercan, J. A. Jansen, C. T. Laurencin, W. J. Li, R. Murugan, L. S. Nair, S. Ramakrishna, R. S. Tuan, T. J. Webster & A. G. Mikos (2007) Nanobiomaterial applications in orthopedics. *J Orthop Res*, 25, 11-22.
- Deckers, M., R. van Bezooijen, G. van der Horst, J. Hoogendam, C. van der Bent, S. Papapoulos & C. Lowik (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*, 143, 1545-1553.
- Dimitriou, R., E. Tsiridis & P. V. Giannoudis (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*, 36, 1392-404.
- Distler, J., A. Hirth, M. Kurowska-Stolarska, R. Gay, S. Gay & O. Distler (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine*, 47, 149-161.
- Distler, O. 2003. Hypoxie und Angiogenese in rheumatischen Erkrankungen. Zeitschrift für Rheumatologie: Steinkopf Verlag 2003.
- Dorozhkin, S. V. (2010) Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, 31, 1465-85.
- Downey, P. & M. Siegel (2006) Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical Therapy*, 86, 77-91.
- Dupont, K. M., K. Sharma, H. Y. Stevens, J. D. Boerckel, A. J. García & R. E. Guldberg (2010) Human stem cell delivery for treatment of large segmental bone defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3305-10.
- Einhorn, T. A. (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S7-21.

- Einhorn, T. A., R. J. Majeska, E. B. Rush, P. M. Levine & M. C. Horowitz (1995) The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res*, 10, 1272-81.
- Feng, L., S. Li, H. Li, J. Zhai, Y. Song, L. Jiang & D. Zhu (2002) Super-hydrophobic surface of aligned polyacrylonitrile nanofibers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41, 1221-3.
- Ferrara, N. & T. DavisSmyth (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*, 18, 4-25.
- Ferrara, N., H. Gerber & J. LeCouter (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9, 669-676.
- Ferrara, N., K. Houck, L. Jakeman, J. Winer & D. Leung (1991) The vascular endothelial growth-factor family of polypeptides. *Journal of Cellular Biochemistry*, 47, 211-218.
- Flatley, T. J., K. L. Lynch & M. Benson (1983) Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clin Orthop Relat Res*, 246-52.
- Formhals, A. 1934. Process and apparatus for preparing artificial threads. USA.
- Gaber, T., R. Dziurla, R. Tripmacher, G. R. Burmester & F. Buttgereit (2005) Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis*, 64, 971-80.
- Gauthier, O., J. M. Bouler, E. Aguado, P. Pilet & G. Daculsi (1998) Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*, 19, 133-9.
- Geris, L., A. Gerisch, J. V. Sloten, R. Weiner & H. V. Oosterwyck (2008) Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *J Theor Biol*, 251, 137-58.
- Gerstenfeld, L. C., Y. M. Alkhiary, E. A. Krall, F. H. Nicholls, S. N. Stapleton, J. L. Fitch, M. Bauer, R. Kayal, D. T. Graves, K. J. Jepsen & T. A. Einhorn (2006) Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem*, 54, 1215-28.
- Gerstenfeld, L. C., D. M. Cullinane, G. L. Barnes, D. T. Graves & T. A. Einhorn (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*, 88, 873-84.
- Giannoudis, P. V., H. Dinopoulos & E. Tsiridis (2005) Bone substitutes: an update. *Injury*, 36 Suppl 3, S20-7.
- Giavaresi, G., M. Tschon, V. Borsari, J. H. Daly, J. J. Liggat, M. Fini, V. Bonazzi, A. Nicolini, A. Carpi, M. Morra, C. Cassinelli & R. Giardino (2004) New polymers for drug delivery systems in orthopaedics: in vivo biocompatibility evaluation. *Biomed Pharmacother*, 58, 411-7.
- Graw, J. 2010. *Genetik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Greiner, A. & J. H. Wendorff (2007) Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46, 5670-703.
- Gupta, K. & J. Zhang (2005) Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J*, 81, 236-42.
- Heinemann, S., M. Gelinsky, H. Worch & T. Hanke (2011) [Resorbable bone substitution materials: An overview of commercially available materials and new approaches in the field of composites]. *Orthopade*, 40, 761-73.
- Henne-Bruns, D., M. Dürig, B. Kremer & H. Oestern. 2007. *Duale Reihe - Chirurgie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Hing, K. A. (2004) Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 362, 2821-50.
- Hing, K. A., B. Annaz, S. Saeed, P. A. Revell & T. Buckland (2005) Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. *J Mater Sci Mater Med*, 16, 467-75.
- Hou, C. H., R. S. Yang & S. M. Hou (2005) Hospital-based allogenic bone bank--10-year experience. *J Hosp Infect*, 59, 41-5.
- Houck, K., N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li & D. Leung (1991) The vascular endothelial growth-factor family - identification of a 4th molecular-species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology*, 5, 1806-1814.
- Huang, Y. C., D. Kaigler, K. G. Rice, P. H. Krebsbach & D. J. Mooney (2005) Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res*, 20, 848-57.
- Ignatius, A. A., O. Betz, P. Augat & L. E. Claes (2001) In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res*, 58, 701-9.
- Jandial, R., M. Y. Chen & J. Ciacchi (2011) HIF-1 α potentiates mesenchymal stem cell mediated osteogenesis by coupling to angiogenesis. *Neurosurgery*, 69, N13-4.
- Jia, H., G. Zhu, B. Vugrinovich, W. Kataphinan, D. H. Reneker & P. Wang (2002) Enzyme-Carrying Polymeric Nanofibers Prepared via Electrospinning for Use as Unique Biocatalysts. *Biotechnology Progress*, 18, 1027-1032.
- Jiang, B. H., E. Rue, G. L. Wang, R. Roe & G. L. Semenza (1996a) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271, 17771-8.
- Jiang, B. H., G. L. Semenza, C. Bauer & H. H. Marti (1996b) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol*, 271, C1172-80.
- Kanczler, J. M. & R. O. Oreffo (2008) Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*, 15, 100-14.

- Kessler, E., K. Takahara, L. Biniaminov, M. Brusel & D. Greenspan (1996) Bone morphogenetic protein-1: The type I procollagen C-proteinase. *Science*, 271, 360-362.
- Kohn, S., J. Nagy, H. Dvorak & A. Dvorak (1992) Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins - structural basis for the hyperpermeability of tumor blood-vessels. *Laboratory Investigation*, 67, 596-607.
- Komatsu, D. & M. Hadjiargyrou (2004) Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone*, 34, 680-688.
- Kurz, H. (2000) Physiology of angiogenesis. *Journal of Neuro-Oncology*, 50, 17-35.
- Le, A. X., T. Miclau, D. Hu & J. A. Helms (2001) Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res*, 19, 78-84.
- Lee, R. J., M. L. Springer, W. E. Blanco-Bose, R. Shaw, P. C. Ursell & H. M. Blau (2000) VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation*, 102, 898-901.
- Li, W. J., J. A. Cooper, R. L. Mauck & R. S. Tuan (2006) Fabrication and characterization of six electrospun poly(alpha-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomater*, 2, 377-85.
- Liao, S., B. Li, Z. Ma, H. Wei, C. Chan & S. Ramakrishna (2006) Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomed Mater*, 1, R45-53.
- Lichte, P., H. C. Pape, T. Pufe, P. Kobbe & H. Fischer (2011) Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury*, 42, 569-73.
- Matsumoto, T. & H. Mugishima (2006) Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 13, 130-135.
- Matthews, J. A., G. E. Wnek, D. G. Simpson & G. L. Bowlin (2002) Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules*, 3, 232-238.
- Miquerol, L., B. L. Langille & A. Nagy (2000) Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*, 127, 3941-6.
- Muschler, G. F., C. Nakamoto & L. G. Griffith (2004) Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*, 86-A, 1541-58.
- Nagy, J., D. Feng, E. Vasile, W. Wong, S. Shih, A. Dvorak & H. Dvorak (2006) Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Laboratory Investigation*, 86, 767-780.
- Novosel, E. C., C. Kleinhans & P. J. Kluger (2011) Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 300-11.

- Patel, Z. S., S. Young, Y. Tabata, J. A. Jansen, M. E. Wong & A. G. Mikos (2008) Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*, 43, 931-40.
- Pelker, R. R., G. E. Friedlaender, T. C. Markham, M. M. Panjabi & C. J. Moen (1984) Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res*, 1, 405-11.
- Peng, H., A. Usas, A. Olshanski, A. M. Ho, B. Gearhart, G. M. Cooper & J. Huard (2005) VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res*, 20, 2017-27.
- Peng, H., V. Wright, A. Usas, B. Gearhart, H. C. Shen, J. Cummins & J. Huard (2002) Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest*, 110, 751-9.
- Petersen, W., T. Pufe, C. Stärke, T. Fuchs, S. Kopf, W. Neumann, T. Zantop, J. Paletta, M. Raschke & R. Becker (2007) The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings. *Arch Orthop Trauma Surg*, 127, 235-40.
- Poncelet, A. J., D. Denis & P. Gianello (2009) Cellular xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 14, 168-74.
- Porter, J. R., T. T. Ruckh & K. C. Popat (2009) Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*, 25, 1539-60.
- Pruss, A. & R. von Versen (2007) [Influence of European regulations on quality, safety and availability of cell and tissue allografts in Germany]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 39, 81-7.
- Riddle, R. C., R. Khatir, E. Schipani & T. L. Clemens (2009) Role of hypoxia-inducible factor-1 α in angiogenic-osteogenic coupling. *J Mol Med (Berl)*, 87, 583-90.
- Sakou, T. (1998) Bone morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. *Bone*, 22, 591-603.
- Santos, M. I. & R. L. Reis (2010) Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci*, 10, 12-27.
- Schiebler, T.-H. & H.-W. Korf. 2007. *Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Berlin: Springer.
- Schieker, M., C. Heiss & W. Mutschler (2008) [Bone substitutes]. *Unfallchirurg*, 111, 613-9; quiz 620.
- Schieker, M. & W. Mutschler (2006) Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods. *Unfallchirurg*, 109, 715-+.

- Schofer, M., U. Boudriot, S. Bockelmann, A. Walz, J. Wendorff, A. Greiner, J. Paletta & S. Fuchs-Winkelmann (2009a) Effect of direct RGD incorporation in PLLA nanofibers on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 20, 1535-1540.
- Schofer, M., U. Boudriot, C. Wack, I. Leifeld, C. Grabedunkel, R. Dersch, M. Rudisile, J. Wendorff, A. Greiner, J. Paletta & S. Fuchs-Winkelmann (2009b) Influence of nanofibers on the growth and osteogenic differentiation of stem cells: a comparison of biological collagen nanofibers and synthetic PLLA fibers. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 20, 767-774.
- Schofer, M., S. Fuchs-Winkelmann, C. Grabedunkel, C. Wack, R. Dersch, M. Rudisile, J. Wendorff, A. Greiner, J. Paletta & U. Boudriot (2008a) Influence of Poly(L-Lactic Acid) Nanofibers and BMP-2-Containing Poly(L-Lactic Acid) Nanofibers on Growth and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Thescientificworldjournal*, 8, 1269-1279.
- Schofer, M., S. Fuchs-Winkelmann, C. Wack, M. Rudisile, R. Dersch, I. Leifeld, J. Wendorff, A. Greiner, J. Paletta & U. Boudriot (2009c) Lack of Obvious Influence of PLLA Nanofibers on the Gene Expression of BMP-2 and VEGF during Growth and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Thescientificworldjournal*, 9, 313-319.
- Schofer, M. D., S. Fuchs-Winkelmann, C. Graebduenkel, C. Wack, R. Dersch, M. Rudisile, J. H. Wendorff, A. Greiner, J. R. J. Paletta & U. Boudriot (2008b) Influence of Poly(L-Lactic Acid) Nanofibers and BMP-2-Containing Poly(L-Lactic Acid) Nanofibers on Growth and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Thescientificworldjournal*, 8, 1269-1279.
- Schofer, M. D., P. P. Roessler, J. Schaefer, C. Theisen, S. Schlimme, J. T. Heverhagen, M. Voelker, R. Dersch, S. Agarwal, S. Fuchs-Winkelmann & J. R. J. Paletta (2011a) Electrospun PLLA Nanofiber Scaffolds and Their Use in Combination with BMP-2 for Reconstruction of Bone Defects. *PLoS ONE*, 6, e25462.
- Schofer, M. D., A. Veltum, C. Theisen, F. Chen, S. Agarwal, S. Fuchs-Winkelmann & J. R. Paletta (2011b) Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*, 22, 1753-62.
- Senger, D., L. Vandewater, L. Brown, J. Nagy, K. Yeo, T. Yeo, B. Berse, R. Jackman, A. Dvorak & H. Dvorak (1993) Vascular-Permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 12, 303-324.

- Simmons, D. (1985) Fracture-healing perspectives. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 100-113.
- Solheim, E. (1998) Growth factors in bone. *Int Orthop*, 22, 410-6.
- Springer, M. L., A. S. Chen, P. E. Kraft, M. Bednarski & H. M. Blau (1998) VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell*, 2, 549-58.
- Steinbrech, D. S., B. J. Mehrara, P. B. Saadeh, J. A. Greenwald, J. A. Spector, G. K. Gittes & M. T. Longaker (2000) VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278, C853-60.
- Street, J., M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F. Peale, N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J. Cleland, A. Daugherty, N. van Bruggen, H. Redmond, R. Carano & E. Filvaroff (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9656-9661.
- Street, J., J. Wang, Q. Wu, A. Wakai, A. McGuinness & H. Redmond (2001) The angiogenic response to skeletal injury is preserved in the elderly. *Journal of Orthopaedic Research*, 19, 1057-1066.
- Su, Y., Q. Su, W. Liu, M. Lim, J. R. Venugopal, X. Mo, S. Ramakrishna, S. S. Al-Deyab & M. El-Newehy (2012) Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 8, 763-71.
- Szentivanyi, A., T. Chakradeo, H. Zernetsch, B. Glasmacher (2011) Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 209-220.
- ten Dijke, P., J. Fu, P. Schaap & B. Roelen (2003) Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 85A, 34-38.
- Truumees, E. & H. Herkowitz. 1999. Alternatives to Autologous Bone Harvest in Spine Surgery. 77–88. The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal.
- Van der Stok, J., E. Van Lieshout, Y. El-Massoudi, G. Van Kralingen & P. Patka (2011) Bone substitutes in the Netherlands - A systematic literature review. *Acta Biomaterialia*, 7, 739-750.
- Verron, E., I. Khairoun, J. Guicheux & J.-M. Bouler (2010) Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. *Drug Discovery Today*, 15, 547-552.
- Vincenti, V., C. Cassano, M. Rocchi & G. Persico (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93, 1493-1495.

- Wan, C., J. Shao, S. R. Gilbert, R. C. Riddle, F. Long, R. S. Johnson, E. Schipani & T. L. Clemens (2010) Role of HIF-1 α in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*, 1192, 322-6.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue & G. L. Semenza (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5510-4.
- Wang, Y., C. Wan, L. Deng, X. Liu, X. Cao, S. R. Gilbert, M. L. Boussein, M. C. Faugere, R. E. Guldberg, L. C. Gerstenfeld, V. H. Haase, R. S. Johnson, E. Schipani & T. L. Clemens (2007) The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*, 117, 1616-26.
- Wang, Y., M. Zheng, H. Lu, S. Feng, G. Ji & J. Cao (2010) Template synthesis of carbon nanofibers containing linear mesocage arrays. *Nanoscale Res Lett*, 5, 913-6.
- Weiss, C. 2004. Normoxie? , S. 32-37. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart: Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.
- Whang, K., K. E. Healy, D. R. Elenz, E. K. Nam, D. C. Tsai, C. H. Thomas, G. W. Nuber, F. H. Glorieux, R. Travers & S. M. Sprague (1999) Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng*, 5, 35-51.
- Wozney, J. M., V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, R. M. Hewick & E. A. Wang (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242, 1528-34.
- Xiao, C., H. Zhou, G. Liu, P. Zhang, Y. Fu, P. Gu, H. Hou, T. Tang & X. Fan (2011) Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced bone regeneration. *Biomed Mater*, 6, 015013.
- Yang, S., K. F. Leong, Z. Du & C. K. Chua (2001) The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*, 7, 679-89.
- Young, S., Z. S. Patel, J. D. Kretlow, M. B. Murphy, P. M. Mountziaris, L. S. Baggett, H. Ueda, Y. Tabata, J. A. Jansen, M. Wong & A. G. Mikos (2009) Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model. *Tissue Eng Part A*, 15, 2347-62.
- Younger, E. M. & M. W. Chapman (1989) Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*, 3, 192-5.
- Zhang, Y., C. T. Lim, S. Ramakrishna & Z. M. Huang (2005) Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J Mater Sci Mater Med*, 16, 933-46.
- Zou, D., Z. Zhang, D. Ye, A. Tang, L. Deng, W. Han, J. Zhao, S. Wang, W. Zhang, C. Zhu, J. Zhou, J. He, Y. Wang, F. Xu, Y. Huang & X. Jiang (2011) Repair of critical-sized rat calvarial

defects using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hypoxia-inducible factor-1 α . *Stem Cells*, 29, 1380-90.

11. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren (nur Nachnamen in alphabetischer Reihenfolge):

Adamkiewicz, Albert, Aumüller, Barth, Basler, Bartsch, Baum, Baumann, Braun, Czubayko, Dabrock, Daut, Diez, Duda, Eilers, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Gress, Grundmann, Grzeschik, Heintze, Hertl, Höffken, Hoffmann, Hofmann, Hoyer, Käuser, Kann, Kanngießer, Kienapfel, Klose, König, Koolman, Kühnert, Lill, Löffler, Lohoff, Lüers, Lüers, Maier, Maisch, Mandrek, Michel, Michiels-Corsten, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Neumüller, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Paletta, Plant, Ramaswami, Renz, Richter, Rothmund, Röhm, Röper, Ruchholtz, Schäfer, Schmiedel, Seitz, Seifart, Schmidt, Schmitt, Schofer, Steiniger, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Welter, Werner, Westermann, Zettl

12. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. M. Schofer, leitender Arzt im ORTHOmedic Gelenkzentrum Frankfurt-Offenbach, herzlich bedanken für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Möglichkeit neben dem Studium Einblicke in die klinisch, experimentelle Forschung zu erlangen und vor allem für die sehr gute Betreuung.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Fuchs-Winkelmann bedanken, ohne sie wäre ein gutes Arbeiten in den Laboren der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie nicht möglich gewesen.

Herzlich möchte ich mich ferner bei meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. J. Paletta für die Begleitung, Unterstützung und Förderung während der gesamten Arbeitsphase bedanken. Stets hatte er ein offenes Ohr und gute Ratschläge.

Frau E. Archontidou-Aprin stand mir im Laboralltag mit praktischen Ratschlägen, sowie einer stets guten Laune zur Seite, hierfür sowie für die außerordentlich nette Zusammenarbeit möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken.

Bei Frau S. Schlimme möchte ich mich für die Einführung und Einarbeitung in die Laborarbeit bedanken.

Ich danke meinen Freunden, welche mich mit ihrer Hilfsbereitschaft und Freundschaft während des Studiums bereichert und unterstützt haben.

Meinem Mann Lukas möchte ich für die Begleitung während des gesamten Prozesses danken, angefangen bei den experimentellen Versuchen bis hin zum vollendeten Schriftstück, für das immer offene Ohr, die Unterstützung und Motivation.

Mein letzter Dank gilt meinen Eltern, die mich immer kompromisslos unterstützt haben.